Série A, n° 3346
N° d'ordre : 4218

THÈSES

présentées

à la FACULTÉ DES SCIENCES DE L'UNIVERSITÉ DE PARIS

pour obtenir

LE GRADE DE DOCTEUR ÈS-SCIENCES PHYSIQUES

par

JACQUES REYNAUD

PREMIERE THESE

ÉTUDE ET ESSAIS D'INTERPRÉTATION DES ANOMALIES DE L'ÉLECTROPHORÈSE EN VEINE LIQUIDE DE FAIBLE FORCE IONIQUE

DEUXIEME THESE. — Propositions données par la Faculté

Soutenues le 29 Janvier 1960 devant la Commission d'examen

MM. WURMSER *Président,*
TONNELAT
Mlle QUINTIN } *Examinateurs.*

SOPIC
36, BOULEVARD MICHELET, 36
MARSEILLE
—
1959

Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA41553814_0066

TRAVAIL
DU LABORATOIRE DE CHIMIE BIOLOGIQUE
DE LA FACULTÉ DE MÉDECINE ET DE PHARMACIE
ET
DU CENTRE MUNICIPAL D'ÉLECTROPHORÈSE
DE MARSEILLE

Série A, n° 3346
N° d'ordre : 4218

THÈSES

présentées

à la FACULTÉ DES SCIENCES DE L'UNIVERSITÉ DE PARIS

pour obtenir

LE GRADE DE DOCTEUR ÈS-SCIENCES PHYSIQUES

par

JACQUES REYNAUD

PREMIERE THESE

ÉTUDE ET ESSAIS D'INTERPRÉTATION DES ANOMALIES DE L'ÉLECTROPHORÈSE EN VEINE LIQUIDE DE FAIBLE FORCE IONIQUE

DEUXIEME THESE. — Propositions données par la Faculté

Soutenues le 29 Janvier 1960 devant la Commission d'examen

MM. WURMSER *Président,*
TONNELAT
Mlle QUINTIN } *Examinateurs.*

R. UNIV.
BIBLIOTHEEK
LEIDEN

SOPIC
36, BOULEVARD MICHELET, 36
MARSEILLE
1959

FACULTÉ DES SCIENCES DE L'UNIVERSITÉ DE PARIS

Doyen ..... J. PERES

PROFESSEURS :

JULIA (G.)	T Analyse et Algèbre sup.
FOCH	T Mécan. physique et expérim.
DE BROGLIE	T Théories physiques
PRENANT	T Anatomie et Histol. comparées
PERES	T Mécan. des Fluides et applic.
CURIE (M.)	T Physique (S.P.C.N.)
BARRABE	T Géol. struct. et Géol appliq.
BOURCART (J.)	T Géogr. phys. et géol. dynam.
PLANTEFOL	T Botanique
GRASSE	T Evolution des êtres organisés
PREVOST	T Chimie organique
BOULIGAND	T Application de l'analyse à la Géométrie
CHAUDRON	T Chimie appliquée
WYART	T Minéralogie
TEISSIER	T Zoologie
MANGENOT	T Biologie Végétale
AUGER (P.)	T Physique quantiq. et relativ.
MONNIER	T Physiologie générale
PIVETEAU	T Paléontologie
ROCARD	T Physique (E.N.S.)
CARTAN (H.)	T Mathématiques (E.N.S.)
LAFFITTE	T Chimie générale
FAVARD	T Géométrie supérieure
COULOMB	T Physique du Globe
COUSIN (Mlle)	T Biologie animale (S.P.C.N.)
CHRETIEN	T Chimie minérale
DRACH (P.)	T Zoologie
KASTLER	T Physique (E.N.S.)
EPHRUSSI	T Génétique
WURMSER	T Biologie physico-chimique
RIVIERE	T Géologie (S.P.C.N.)
GAUTHERET	T Biologie végétale (P.C.B.)
LUCAS	T Recherches physiques
THOMAS (A.)	T Biologie cellulaire
ARNULF	T Optique appliquée
MORAND (M.)	T Enseignement de Physique
SOLEILLET	T Physique
FORTIER	T Mécan. expérim. des fluides
DANJON	T Astronomie
LAPORTE	T Phys. gén. et Radioactivité
JANET	T Méc. analyt. et Méc. céleste
PETIT	T Biologie maritime
QUENEY	T Météorologie et dynamique atmosphérique
GALLIEN	T Embryologie
EICHHORN	T Biologie Végétale (S.P.C.N.)
DE CUGNAC	T Biologie Végétale (S.P.C.N.)
CAUCHOIS (Mlle)	T Chimie Physique
THELLIER	T Physique du Globe
L'HERITIER	T Génétique
GRIVET	T Radioélectricité
PONCIN	T Mécanique Générale
DUBREIL	T Arith. et théorie des nombres
OUELET	T Chimie organique
CAGNIARD	T Géophysique appliquée
CHAMPETIER	T Chimie macromoléculaire
CUVILLIER	T Géol. struct. et Géol. appliq.
JUNG	T Pétrographie
TRILLAT	T Microscop. et diffract. électr.
WIEMANN	T Chimie organ. et structurale
JACQUINOT	T Spectroscopie et phys. céleste
VASSY	T Physique de l'Atmosphère
DESTOUCHES	T Théories physiques
PRUVOST (M.)	T Géologie
AMIEL	T Chimie générale (P.C.B.)
HOCART	T Minéralogie
MATHIEU (J.-P.)	T Physique (P.C.B.)
COUTEAUX	T Biologie Animale (P.C.B.)
MAY	T Biologie Animale (P.C.B.)
CHOQUET	T Calcul différentiel et Intégral
FELDMANN	T Biologie (P.C.B.)
GUINIER	T Physique des solides
JOST	T Physiologie comparée
FORTET	T Calcul des probabilités
SCHWARTZ	T Calcul différentiel et Intégral
CHOUARD	T Physiologie Végétale
MALAVARD	T Aviation
BRELOT	T Calcul différentiel
NORMANT	T Chimie organique
BENARD	T Chimie minérale
BUVAT	T Botanique (E.N.S.)
DUGUE	T Statistiques mathématiques
GELOSO	T Chimie (S.P.C.N.)
SOULAIRAC	T Psychophysiologie
ULRICH	T Physiologie Végétale
MARECHAL	T Optique théorique et appliq.
KIRRMANN	T Théories chimiques
CHADEFAUD	T Botanique
DESTRIAU	T Physique (M.P.C.)
LE BRETON (Mlle)	T Physiologie générale
SALEM	T Mathématiques générales
LELONG	T Mathématiques générales
DEVILLERS	Anatomie et Hist. comparées
EHRESMANN	T Topologie algébrique
FRANÇON	T Physique (S.P.C.N.)
GLANGEAUD	T Géogr. phys. et géol. dynam.
GODEMENT	T Mathématiques (M.P.C.)
PISOT	T Calcul des probabilités
ROCH (E.)	T Géologie
SCHATZMANN	Astrophysique
TERMIER	T Paléontologie stratigraphique
ZAMANSKY	T Mathématiques générales
LENNUIER	Physique (M.G.P.)
RIZET	Génétique
ROUTHIER	Géologie appliquée
TONNELAT (Mme)	T Théories physiques
DIXMIER	T Mathématiques (M.P.C.)
SOUCHAY	T Chimie générale
AIGRAIN	T Electrotechnique
BRUSSET	Chimie minérale
LEVY (M.)	Physique théorique
CHAIX (Mme)	Chimie biologique
HUREL-PY (Mme)	Biologie Végétale (P.C.B.)
PIAUX	Chimie (P.C.B.)
BRUN	Mécan. expérim. des fluides
LEDERER	T Chimie des substances organiques naturelles
DUBREIL (Mme)	T Mathématiques
LELONG (Mme)	T Mathématiques (E.N.S.)
BELLAIR	T Géologie (S.P.C.N.)
COTTE	T Physique (M.P.C.)
DUBOIS (J.-E.)	T Chimie (S.P.C.N.)
LAMOTTE	Zoologie (E.N.S.)
LE ROLLAND	Mécanique des fluides
MICHEL A.	T Chimie (S.P.C.N.)
OLMER	T Energétique Générale
ROUAULT	T Physique Générale
GAUTHIER	T Mécanique appliquée
BARCHEWITZ	Chimie Physique
BROSSEL	Physique atomique
BUSER	Biologie animale (P.C.B.)
CAMUS	Biologie Végétale (P.C.B.)
CASTAING	Physique Générale
CURIEN	Minéralogie et cristallogr.
MOYSE	Physiologie Végétale
NOIROT	Evolution des êtres organisés
PANNETIER	Chimie (S.P.C.N.)
POSSOMPES	Biologie Animale (P.C.B.)
PULLMANN	Chimie Théorique
TEILLAC	Physique Nucléaire et Radioactivité
TONNELAT	Biologie physico-chimique
VILLE	Econométrie
WILLEMART	Chimie (P.C.B.)
DODÉ	T Chimie
FREYMANN	T Physique (S.P.C.N.)
GUINOCHET	T Biologie Végétale (Orsay)
ROLLET	T Chimie (P.C.B.)
JOSIEN (Mlle)	T Chimie (P.C.B.)
CHEVALLEY	T Géométrie Algébrique et théorie des groupes
ARNOULT	T Physique (Orsay)
CRAPELLE	T Physique (P.C.B.)
DELANGE	T Mathématiques (Orsay)
DENY	T Mathématiques (Orsay)
GERMAIN	T Mécan. théorique des fluides
LUCAS (G.)	T Géologie

Secrétaire Général ..... C. MONIER

A MON PERE ET A MA MERE

Que ce travail soit pour eux une faible compensation à leurs sacrifices et un témoignage de ma profonde affection.

A MA FEMME

A MES ENFANTS

A TOUS LES MIENS

A mon Maitre
Monsieur le Professeur Y. DERRIEN

Qui a inspiré et dirigé ce travail.

A Monsieur le Professeur A. TISELIUS
et au Docteur H. SVENSSON

Qui ont eu l'extrême bienveillance de m'encourager dans mon travail en m'aidant de leurs critiques et de leurs conseils.

A Monsieur le Professeur J. ROCHE

En témoignage de reconnaissance pour l'intérêt qu'il m'a toujours porté au cours de mes années de recherches.

A Monsieur le Professeur P. DESNUELLE

Qui a suivi l'évolution de ce travail et m'avait fait le très grand honneur d'accepter de le juger.

A MES JUGES

A mon Président de Thèse
Monsieur le Professeur R. WURMSER

Qui m'a fait le grand honneur d'accepter la présidence de mon Jury de Thèse, en modeste témoignage de mon infinie gratitude.

A Monsieur le Professeur J. TONNELAT

Qui a bien voulu me guider de ses conseils et accepter de rapporter ce travail. Qu'il me soit permis de lui exprimer ma très grande reconnaissance.

A Mademoiselle le Professeur M. QUINTIN

A qui je dois d'utiles suggestions et que je remercie d'avoir accepté de siéger dans mon Jury de Thèse.

A MES CAMARADES

du Laboratoire de Chimie biologique de la Faculté Mixte de Médecine et de Pharmacie

ET AU PERSONNEL

du Laboratoire Municipal de Biologie et de Chimie de Marseille

ÉTUDE ET ESSAIS D'INTERPRÉTATION DES ANOMALIES DE L'ÉLECTROPHORÈSE EN VEINE LIQUIDE DE FAIBLE FORCE IONIQUE

APPLICATION A L'ETUDE DE L'HETEROGENEITE DE L'HEMOGLOBINE HUMAINE

(Sujets normaux et thalassémiques)

INTRODUCTION

On sait que l'abaissement de la force ionique du solvant a pour effet d'élever le potentiel électrocinétique des macromolécules électrolytiques et, par là, leur vitesse de migration dans un champ électrique. La différence absolue de mobilité de deux protéines de charge voisine peut alors atteindre une valeur suffisante pour que leur individualité électrophorétique puisse se manifester dans leur mélange.

Luetscher, Saifer et Corey, Hoch et coll. sont les premiers à avoir mis à profit de tels effets à l'occasion de leurs recherches sur l'hétérogénéité de la sérumalbumine [72, 73, 92] et de l'hémoglobine humaines [15]. Les résultats obtenus dans ce dernier cas sont particulièrement significatifs. En effet, de pH isolélectrique très voisin, l'hémoglobine de type adulte (Hb A) et celle de type fœtal (Hb F) sont pratiquement indifférenciables par leur électrophorèse dans l'appareil de Tiselius en tampons acides ou alcalins de force ionique I = 0,1 couramment utilisés pour l'individualisation et la caractérisation électrophorétique des hémoglobines anormales. Leur séparation est obtenue en abaissant à 0,03 la force ionique du tampon phosphate disodique de pH = 8,2 [15]. La mobilité d'Hb F est alors légèrement inférieure à celle d'Hb A et chacun de ces chromoprotéides se présente sous forme d'un seul constituant apparemment homogène. Il n'en est plus de même en tampon cacodylique de force ionique = 0,0175 et de pH = 6,5. De telles conditions, réalisées à notre insu en 1953 [32] par une erreur de dilution du tampon et décrites en 1955 [33, 34], sont les plus favorables à la mise en évidence de l'hétérogénéité des hémoglobines. Dans le cas de préparations oxygénées ou oxycarbonées du pigment de l'adulte normal, celle-ci se manifeste régulièrement par la séparation progressive de deux constituants désignés par *3* et *1* dans l'ordre de leur mobilité électrophorétique croissante (fig. 1 et fig. 2). Le pic *3* est toujours suivi par deux constituants mineurs ; le plus lent de ceux-ci désigné par *1*, correspond à une protéine d'accompagnement

[29, 27, 31]. Le pic *4*, hétérogène, se subdivise plus ou moins nettement suivant les cas en deux fractions *4'* et *4* ; il est toujours précédé par une trace d'un constituant légèrement plus rapide, incolore ou faiblement coloré, désigné par *5*. L'hétérogénéité dHb A a également été observée dans des conditions expérimentales similaires par SHAVIT et BREUER [99] et, plus récemment, par BERRY et CHANUTIN [16].

Cependant, l'abaissement de la force ionique ayant pour corrolaire un accroissement de la fonction de KOHLRAUSCH B_1 du tampon (beharrliche funktion)[1], les incréments de conductivité au niveau des frontières prennent des valeurs élevées en sorte que l'accroissement du pouvoir résolutif de l'électrophorèse, obtenu dans de telles conditions, va nécessairement de pair avec une amplification des anomalies de frontières prévues par la théorie de SVENSSON [105]. Mais les auteurs précités ont constaté

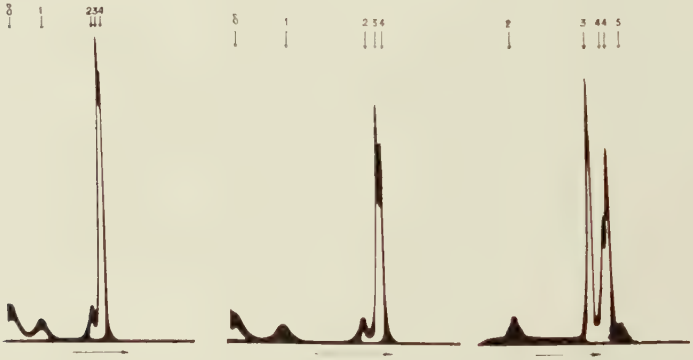


FIGURE 1. — Evolution en fonction du temps d'électrophorèse, du diagramme d'une carboxyhémoglobine d'homme adulte normal (de gauche à droite : 9.000 sec., 14.000 sec., 61.000 sec.). Concentration en COHb = 1,25 p. 100 ; tampon = acide cacodylique, cacodylate de sodium, chlorure de sodium ; I = 0,0175 ; pH = 6,5 ; gradient de potentiel = 6,75 volts/cm. ; température = + 2° C.

qu'à ces dernières se surajoutent des perturbations affectant systématiquement la branche descendante et dont la nature n'a pas encore pu être précisée. En sorte que, à l'exception de SHAVIT et BREUER, ces auteurs ont été conduits à négliger la branche descendante, ne considérant comme significatifs que les diagrammes enregistrés dans la branche ascendante.

(1) Nous rappelons que cette fonction a été utilisée dès 1932 par MAC INNES et LONSWORTH [73bis] sous le nom de « regulating function ». Egale à la somme des rapports entre la concentration équivalente *c* et la mobilité *u* de tous les ions *i* présents dans le milieu, sa valeur : $B = \Sigma\, c_i/u_i$, est indépendante du temps d'électrophorèse à condition que la mobilité des ions puisse être considérée comme constante.

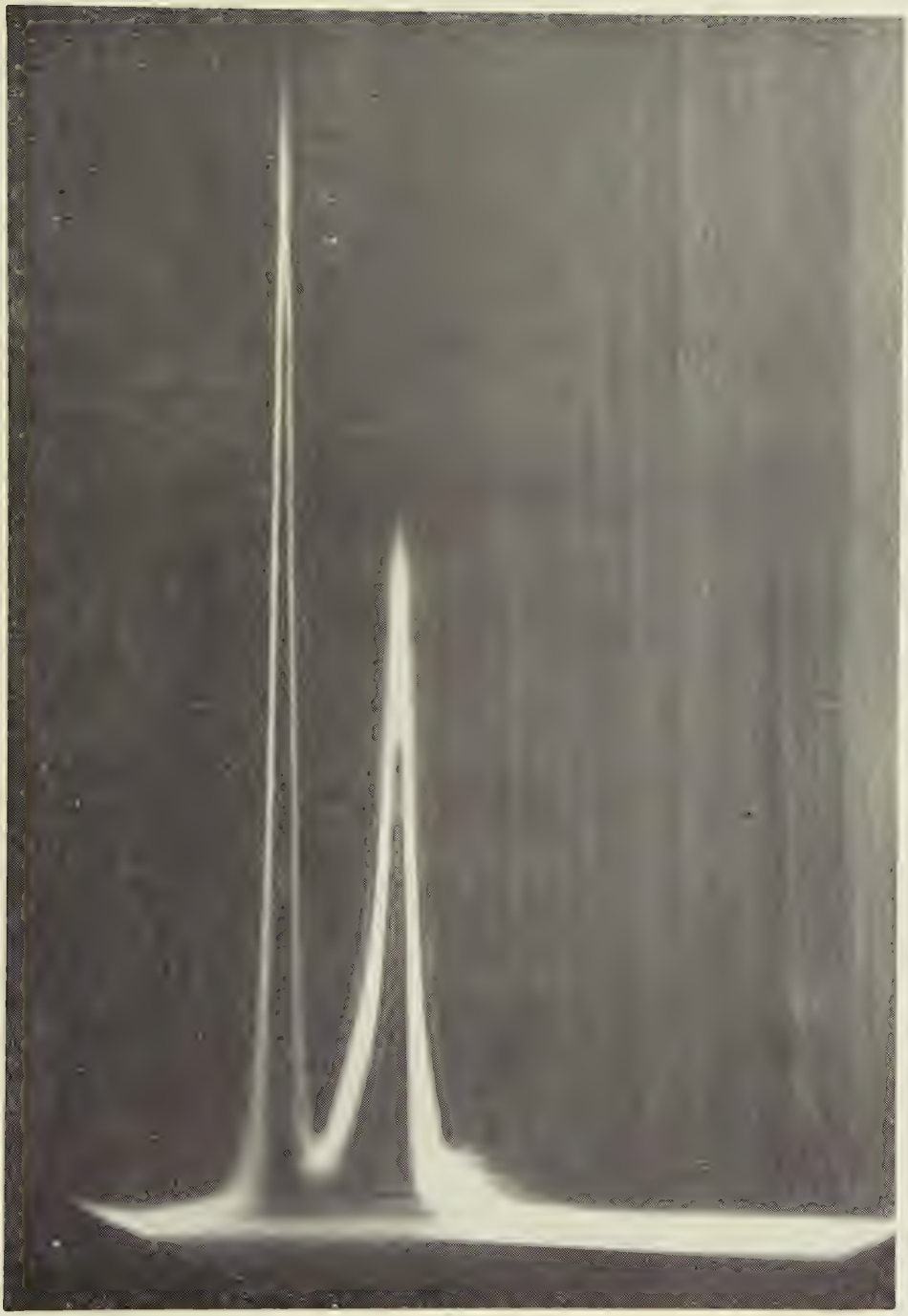


FIGURE 2. — Reproduction agrandie du diagramme d'une carboxyhémoglobine d'adulte normal enregistré après 42 heures d'électrophorèse

OBJET DU TRAVAIL

Notre travail, qui entre dans le cadre de recherches sur l'hétérogénéité des hémoglobines en cours dans le laboratoire du Professeur Y. Derrien, *a essentiellement pour objet d'étudier les perturbations qui affectent principalement la branche descendante au cours d'électrophorèse en veine liquide de faible force ionique.*

Nous avons jugé utile de résumer, dans une première partie, la théorie classique des anomalies de frontière, à laquelle nous serons fréquemment conduit à nous référer au cours de notre travail.

Nos recherches personnelles sont rapportées dans la seconde partie qui comprend quatre chapitres.

Le premier est consacré à la description des techniques mises en œuvre, aux précautions imposées par l'électrophorèse en milieux de faible pouvoir tampon en raison de leur faible force ionique et à la détermination des diverses constantes expérimentales utilisées (mobilité des ions du tampon, valence de l'ion hémoglobinique, incrément de vitesse par unité de concentration).

L'ensemble des faits expérimentaux rapportés dans le deuxième chapitre conduit à rattacher aux interactions protéines-anions à la fois les dérogations des équilibres dialytiques aux lois de Donnan et les perturbations siègeant au niveau des frontières mobiles en milieu de faible force ionique.

Dans le troisième chapitre, nous nous attacherons à démontrer que l'hétérogénéité de l'hémoglobine de l'adulte normal n'est pas un effet de ces perturbations mais correspond à la présence de deux hémoglobines électrophorétiquement distinctes et de constituants protéiques mineurs dans les préparations de pigment.

Enfin, dans le quatrième chapitre, une étude comparée du comportement électrophorétique des hémoglobines de l'homme adulte normal, du nouveau-né et des sujets atteints de thalassémie nous permettra d'établir les caractères distinctifs de ces pigments et, notamment, de différencier l'hémoglobine alcalinorésistante des anémiques de Cooley et l'hémoglobine fœtale.

Nota. — On trouvera dans le tableau I la définition des symboles utilisés au cours de l'ensemble de ce travail.

TABLEAU I

Tableau récapitulatif des symboles utilisés

a	=	exposant défini par l'équation (5) p. 70.
a	=	cœfficient défini par l'équation (2), [44], p. 42.
b_i	=	fonction définie par l'équation (32) [106], p. 38.
c_i	=	concentration de l'ion i exprimée en équivalents électrochimiques/ml, avec le signe de la charge.
e	=	$1 + KC'_t = 1 + K_2 C'_2 + K_1 C'_1$.
f	=	cœfficient d'activité.
f	=	cœfficient de friction moléculaire.
i	=	intensité du courant électrique exprimée en ampères.
i	=	densité du courant électrique exprimée en amp./cm^2.
i		indice relatif à l'espèce ionique (placé le premier).
j	=	indice relatif à la frontière ou à la couche liquide immédiatement supérieure (cf. fig. 6), (placé le second).
m	=	poids moléculaire d'un ion environnant.
n	=	nombre total d'ions en présence dans la cuve à électrophorèse.
n	=	indice de réfraction.
q	=	section de la cuve à électrophorèse exprimée en cm^2.
r	=	quotient de la vélocité de l'ion protéïque à dilution infinie dans le tampon par celle obtenue à dilution infinie au-dessous du gradient ε.
r	=	quotient de la charge spécifique de l'ion principal par celle de l'ion environnant i.
t	=	temps exprimé en secondes.
u_i	=	mobilité de l'ion i exprimée en cm^2. volt^{-1}. sec^{-1}.
x	=	coordonnée verticale de la cuve à électrophorèse de section constante.
x''	=	racine de la fonction B(U'') (cf. p. 32), mobilité de la fausse frontière.
z_i	=	valence de l'ion i avec le signe de la charge.
z_p	=	valence de l'ion protéique avec le signe de la charge = charge nette.

A = indice relatif à l'hémoglobine adulte normale.

A' = constante empirique introduite par DAVIS et COHN [26] (cf. p. 110).

A^- = anion.

$B_1 - B_{tamp}$ = fonction de KOHLRAUSCH ou « *beharrliche Funktion* » du milieu 1 c'est-à-dire du tampon seul (cf. p. 26).

$B_{coll.}$ = fonction de KOHLRAUSCH du colloïde seul (cf. p. 26).

$B(\bar{U})$ = fonction définie par l'équation (24) [106] p. 27.

$B(U'')$ = fonction définie p. 31.

C = concentration de l'ion principal exprimé en équiv. électrochim./ml, avec le signe de la charge.

C_1 = concentration de l'ion principal exprimé en g.p.100 ml. L'indice 1 a pour but de différencier cette concentration pondérale de la concentration équivalente.

C'_1 = concentration du constituant le plus rapide 1 dans la portion de veine liquide comprise entre les frontières 1 et 2 (concentration pondérale apparente).

$\mathbf{C}'_1$ = concentration du constituant le plus rapide 1 dans la veine liquide « ajustée » (concentration pondérale réelle).

C'_t = concentration totale des deux constituants 1 et 2 dans la veine liquide « ajustée » (concentration pondérale).

D = indice relatif à l'équilibre dialytique.

D = constante de diffusion.

E = potentiel de membrane.

F = constante de FARADAY = 96490 coulombs/équivalent.

$\mathcal{F}$ = champ électrique exprimé en volts/cm.

I = force ionique.

K = constante de la cellule de conductivité exprimée en cm^{-1}.

K, K_i = incrément de la vélocité par unité de concentration (cf. p. 41 et p. 42).

M = poids moléculaire de l'ion principal (Hb_4 = 66.800).

M = indice relatif à la frontière mobile.

P = indice relatif à la protéine.

P^+ = cation protéique.

PA = complexe anion-protéine.

Q = charge en unités électrostatiques.

Q_i = erreur relative introduite par l'ion i dans l'indice de réfraction des frontières.

Q_s charge spécifique.

S = $V'_{a1} - V'_{a2}$ = différence des vélocités apparentes des deux constituants 1 et 2.

T = indice relatif à la solution tampon.

U = mobilité de l'ion principal.

U_a = mobilité apparente.

U' = mobilité de la frontière mobile définie à partir du milieu 1.

U'' mobilité de la frontière mobile définie à partir du milieu 2.

$\bar{U}$ mobilité de l'ion principal au-dessus de la frontière (cf. p. 27).

$(U)_i$ = mobilité idéale du colloïde.

$(U)_t$ = mobilité théorique du colloïde.

$(U_P)_O$ = mobilité de l'ion protéique P libre à force ionique nulle.

$(U_{PA})_O$ = mobilité du complexe PA à force ionique nulle.

V = vélocité de la frontière mobile exprimée en cm/sec.

V_a = vélocité apparente de la frontière mobile à une concentration protéique déterminée.

V_i = vélocité de l'ion i au-dessus de sa frontière, c'est-à-dire à concentration nulle.

V'_1 = vélocité du constituant le plus rapide 1 à dilution infinie dans la solution tampon initiale (vélocité réelle).

V'_{a1} = vélocité actuelle du constituant le plus rapide 1 dans la portion de veine liquide comprise entre les frontières 1 et 2 (vélocité apparente).

V'_{a2} = vélocité actuelle du constituant le plus lent 2 dans la veine liquide « ajustée » (vélocité apparente).

X = champ électrique en unités électrostatiques.

X_l = position d'un repère arbitraire dans la cuve à l'électrophorèse.

Z = valence de l'ion principal (colloïde).

α = degré de dissociation.

γ = concentration équivalente exprimée en équivalents-gramme /litre; accélération (cf. p. 118).

δ = gradient de sel stationnaire de la branche ascendante (cf. p. 32).

ε = gradient de sel stationnaire de la branche descendante.

ζ = anomalie de frontière (b. descendante).

ζ' = anomalie de frontière (b. ascendante).

θ		température exprimée en °C.
θ		angle de la fente oblique par rapport à la verticale.
$\varkappa$		conductivité exprimée en mho/cm. à la température + 2°C.
$\varkappa_1$	=	conductivité de la solution tampon.
$\varkappa_2$	=	conductivité de la solution protéique.
$\varkappa'$	=	conductivité de la solution « ajustée » de la branche ascendante.
$\varkappa''$	=	conductivité de la solution « ajustée » de la branche descendante.
ν	=	nombre d'anions monovalents combinés à la protéine.
Γ_2	=	force ionique.
Λ	=	conductivité équivalente.
Ω	=	résistance électrique exprimée en ohms.
1	=	indice relatif à l'espèce ionique 1 (placé le premier).
1	=	indice relatif à la couche supérieure à la frontière mobile (placé le second).
2	=	indice relatif à l'espèce ionique 2 (placé le premier).
2	=	indice relatif à la couche inférieure à la frontière mobile (placé le second).
2	=	indice relatif à la couche inférieure de la frontière initiale (placé le second).
'		exposant relatif à la couche 1.
''		exposant relatif à la couche 2.

PREMIERE PARTIE

ANOMALIES DE FRONTIÈRES

Différentes observations faites au cours d'électrophorèses permettent de penser que le gradient de potentiel n'est pas uniforme tout au long de la veine liquide (forme aiguë des frontières de la branche ascendante et forme applatie des frontières de la branche descendante ; mobilités différentes de la même frontière dans les deux branches). On constate également que la proportion du constituant le plus rapide calculée à partir des surfaces est toujours plus importante qu'elle n'est en réalité.

On peut rattacher ces anomalies de frontières à la présence de variation de conductivité tout le long de la cellule.

Il y a en électrophorèse deux sortes de variations de conductivité. La première est imposée par le fait que l'équilibre de Donnan atteint lors de la dialyse précédant l'expérience crée une différence de concentration ionique entre le dialysat (solution tampon) et la solution protéique. La deuxième variation est créée par le passage du courant électrique et celle-ci n'atteint sa valeur limite qu'après résolution complète des frontières. Il y a donc ajustement automatique du milieu conducteur au cours de l'électrophorèse.

Nous nous proposons de rappeler dans ce qui suit comment la théorie de Svensson permet de prévoir de telles variations et comment Hoch a pu les mesurer sur le plan pratique.

I. — **Théorie de Svensson** [105, 106]

En l'absence de toutes anomalies de frontière, c'est-à-dire en électrophorèse idéale, toutes les mobilités ioniques u_i et la

conductivité $\varkappa$ de la solution sont constantes le long de la cellule et sont indépendantes du temps (équation (20) de KOHLRAUSCH [56 bis]) :

$$\frac{\delta c_i}{\delta t} = -i \frac{\delta\left(\frac{c_i u_i}{\varkappa}\right)}{\delta x}$$

c'est-à-dire que :

$$c_i = f\left(x - \frac{i u_i t}{\varkappa}\right)$$

Dans la pratique, toutes les variables c, u, $\varkappa$ possèdent un incrément au niveau de la frontière mobile B sous laquelle se trouve le colloïde et correspondant au front de migration de ce dernier (fig. 3 *a*). En adoptant conventionnellement le sens descendant du courant électrique (direction de l'axe x de la cellule), l'incrément est positif si la variable s'accroît algébriquement en passant de 1 en 2, quelque soit le sens du déplacement de la frontière.

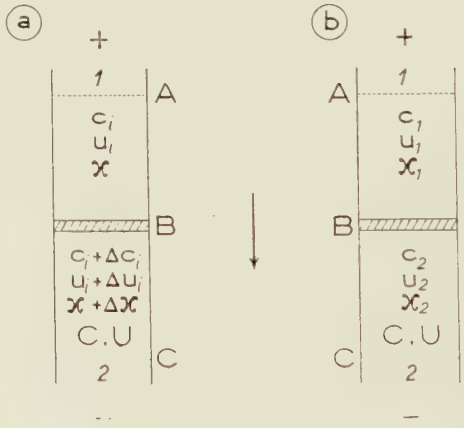


FIGURE 3. — A : Couche de composition constante. B : Frontière mobile ; sa vitesse est positive si elle se déplace dans le sens du courant (migration cathodique). C : Couche de composition constante renfermant le colloïde

La quantité d'un ion quelconque i traversant la couche A par unité de temps est exprimée par le produit de sa concentration c_i par sa vitesse $iu_i/\varkappa$ c'est-à-dire par $c_i u_i\, i/\varkappa$. De même, la quantité de i traversant la couche C par unité de temps et égale à :

$$\frac{(c_i + \Delta c_i)\ (u_i + \Delta u_i)\, i}{\varkappa + \Delta \varkappa}$$

Le nombre d'équivalents de l'ion i passant par unité de section et de temps est égal à la différence :

$$\frac{c_i\, u_i\, i}{\varkappa} - \frac{(c_i + \Delta c_i)\,(u_i + \Delta u_i)\, i}{\varkappa + \Delta \varkappa}$$

Si l'on représente par $-\Delta c_i V$ le même nombre d'équivalents, on peut écrire l'égalité :

$$\frac{c_i\, u_i\, i}{\varkappa} - \frac{(c_i + \Delta c_i)(u_i + \Delta u_i)\, i}{\varkappa + \Delta \varkappa} = -\Delta c_i V$$

Etant donné que :

$$V = \frac{U.i}{\varkappa + \Delta \varkappa}$$

on peut substituer la mobilité U du colloïde à la vélocité V de la frontière :

$$\frac{c_i\, u_i\, i}{\varkappa} = \frac{(c_i + \Delta c_i)(u_i + \Delta u_i)\, i - \Delta c_i . U . i}{\varkappa + \Delta \varkappa}$$

En extrayant $\Delta c_i / c_i$ qui représente l'incrément de concentration de l'ion i, on obtient :

$$\frac{\Delta c_i}{c_i} = \frac{\dfrac{\Delta \varkappa}{\varkappa} - \dfrac{\Delta u_i}{u_i}}{1 + \dfrac{\Delta u_i}{u_i} - \dfrac{U}{u_i}} \qquad \text{((7) [105])}$$

On peut généraliser cette équation en remplaçant les symboles représentés sur le schéma *a* de la figure 3 par ceux du schéma *b* de cette même figure.

En désignant par la différence :

$$\frac{c_{i1}\, u_{i1}\, i}{\varkappa_1} - \frac{c_{i2}\, u_{i2}\, i}{\varkappa_2}$$

la quantité de l'ion *i* passant par sec. et par cm² du milieu 1 dans le milieu 2 et par $(c_{i1} - c_{i2})$ V cette même quantité, on peut écrire l'égalité suivante :

$$\frac{c_{i1}\, u_{i1}\, i}{\varkappa_1} - \frac{c_{i2}\, u_{i2}\, i}{\varkappa_2} = (c_{i1} - c_{i2})\, V$$

On peut substituer à la vélocité V de la frontière les mobilités U' et U'' calculées respectivement à partir des conductivités $\varkappa_1$ et $\varkappa_2$ des milieux 1 et 2 :

$$V = \frac{U' i}{\varkappa_1} = \frac{U'' i}{\varkappa_2}$$

On aboutit ainsi à l'équation symétrique suivante :

$$\frac{c_{i1}\,(u_{i1} - U')}{\varkappa_1} = \frac{c_{i2}\,(u_{i2} - U'')}{\varkappa_2} \qquad ((9)\ [106])$$

dont on déduit les équations généralisées (10) et (11) [106] valable pour tout ion présent des deux côtés ou d'un seul côté de la frontière mobile :

$$(c_{i1} - c_{i2})(u_{i1} - U') = \left(\frac{\varkappa_1}{\varkappa_2} - \frac{u_{i1}}{u_{i2}}\right) c_{i2}\, u_{i2} \qquad ((10)\ [106])$$

$$(c_{i2} - c_{i1})(u_{i2} - U'') = \left(\frac{\varkappa_2}{\varkappa_1} - \frac{u_{i2}}{u_{i1}}\right) c_{i1}\, u_{i1} \qquad ((11)\ [106])$$

Pour de faibles changements de concentration et pour des ions monovalents, on est en droit d'admettre que l'incrément de mobilité d'un ion à travers une frontière mobile est indépendant de la nature de l'ion :

$$\frac{u_{11}}{u_{12}} = \frac{u_{21}}{u_{22}} = \frac{u_{31}}{u_{32}} = \ldots\ldots \frac{u_{n1}}{u_{n2}} \qquad ((12)\ [106])$$

En effet, l'incrément de mobilité résulte des deux causes suivantes :

1° De la différence de viscosité entre les milieux 1 et 2.

2° D'un environnement ionique différent dans ces deux milieux.

De telles différences de conditions de milieu (parmi lesquelles la première est plus déterminante que la seconde) affectent dans le même sens la mobilité des divers ions.

Cette simplification permet ainsi de mettre en évidence un facteur $\frac{\Delta u_i}{u_i}$ indépendant des espèces ioniques.

En ce qui concerne les ions polyvalents et plus spécialement les ions colloïdaux, cette hypothèse n'est pas vérifiable. Nous allons voir comment il est possible de surmonter cette difficulté dans le cas particulier des ions colloïdaux, en mettant à profit le fait que ceux-ci ne sont présents que d'un seul côté de la frontière.

La sommation de tous les ions i permet d'écrire l'équation (7) [105] sous la forme :

$$\sum_i \Delta c_i = \left(\frac{\Delta \varkappa}{\varkappa} - \frac{\Delta u_i}{u_i}\right) \sum_i \frac{c_i}{1 + \frac{\Delta u_i}{u_i} - \frac{U}{u_i}}$$

Si l'on introduit dans cette expression la concentration C du colloïde, uniquement présent au-dessous de la frontière, il résulte de l'application de la loi de l'électroneutralité ($\Sigma c_i = 0$) que, sous la frontière, l'incrément total des concentrations est nul, c'est-à-dire que :

$$\left(\frac{\Delta x}{x} - \frac{\Delta u_i}{u_i}\right) \sum_i \frac{c_i}{1 + \frac{\Delta u_i}{u_i} - \frac{U}{u_i}} + C = 0$$

d'où l'on tire $\frac{\Delta x}{x}$:

$$\frac{\Delta x}{x} = \frac{\Delta u_i}{u_i} - \frac{C\left(1 + \frac{\Delta u_i}{u_i}\right)}{\sum_i \frac{c_i}{1 - \frac{U}{u_i + \Delta u_i}}} \qquad \text{((10) [105])}$$

Le second terme de droite de l'équation (10) [105] n'a une valeur significative que lorsque $\frac{U}{u_i + \Delta u_i}$ est inférieur à 1, c'est-à-dire dans le cas le plus fréquent où les ions du tampon ont une mobilité supérieure à celle du colloïde. Dans de telles conditions, il est possible de simplifier l'équation (10) [105] en développant en série le dénominateur de son second terme :

$$\sum_i \frac{c_i}{1 - \frac{U}{u_i + \Delta u_i}} = \frac{U}{1 + \frac{\Delta u}{u}} \left[\sum \frac{c_i}{u_i} + \frac{U}{1 + \frac{\Delta u}{u}} \cdot \sum \frac{c_i}{u_i^2} + \frac{U}{1 + \frac{\Delta u}{u}} \cdot \sum \frac{c_i}{u_i^3} + \cdots \right] \qquad \text{((11) [105])}$$

Dans cette équation le premier terme $\Sigma \frac{c_i}{u_i}$ est toujours positif, c_i et u_i étant de même signe. Par contre, le second terme renferme une succession de valeurs de même ordre de grandeur mais de signe alternativement opposé dont la somme est, de ce fait, négligeable. Dès lors, ce dénominateur se réduit à :

$$\frac{U}{1 + \frac{\Delta u_i}{u_i}} \cdot \sum \frac{c_i}{u_i}$$

et l'équation (10) [105] devient :

$$\frac{\Delta x}{x} = \frac{\Delta u_i}{u_i} - \frac{C\left(1 + \frac{\Delta u_i}{u_i}\right)}{\frac{U}{1 + \frac{\Delta u_i}{u_i}} \cdot \sum \frac{c_i}{u_i}}$$

Ainsi, le changement de conductivité au niveau d'une frontière mobile est représenté par la somme de deux termes :

$\frac{\Delta u_i}{u_i}$: traduit l'effet de la viscosité et de l'environnement ionique ;

$-\frac{C\left(1+\frac{\Delta u_i}{u_i}\right)}{\frac{U}{1+\frac{\Delta u_i}{u_i}}\sum\frac{c_i}{u_i}}$: tient compte de la charge du colloïde, C étant exprimé en équiv. ml. tel que :

$$C = \frac{Z}{M} \cdot C$$

Par ailleurs :

$$\sum \frac{c_i}{u_i} = B\ \text{tamp.}$$

B tamp. étant la fonction de KOHLRAUSCH relative aux ions du tampon (*).

De même : $\frac{C}{U} = B\ \text{coll.}$

B coll. étant la fonction de KOHLRAUSCH relative à l'ion colloïde.

Ainsi, l'équation (10) [105] peut s'écrire :

$$\frac{\Delta x}{x} = \frac{\Delta u_i}{u_i} - \frac{B\ \text{coll.}}{B\ \text{tamp.}}\left(1+\frac{\Delta u_i}{u_i}\right)^2$$

La valeur $\frac{\Delta u_i}{u_i}$ étant généralement considérée comme négligeable dans les conditions envisagées, l'équation (10) [105] prend enfin la forme remarquable suivante :

$$\frac{\Delta x}{x} = -\frac{B\ \text{coll.}}{B\ \text{tamp.}}$$

Cette équation nous renseigne d'une manière simple sur les facteurs déterminant la valeur de l'incrément de conductivité.

Par définition la fonction B est toujours positive (rapport de deux valeurs de même signe). De ce fait la conductivité décroît toujours de haut en bas.

L'étude de $\Delta x/x$ nous permet d'apprécier la grandeur des anomalies qui seront d'autant plus grandes que :

— la concentration en protéine sera plus élevée,

— la concentration en sels tampons plus faible.

(*) Voir note de bas de page 12.

L'enregistrement de Δz z nous fournit d'excellentes représentations graphiques des frontières. Mais comme les protéines et les sels ne participent pas d'une manière identique à Δz et à Δn, de tels enregistrements ne se prêtent pas directement à la détermination de la proportion réelle des constituants. Nous verrons que les gradients $\frac{\Delta z}{\Delta x}$ et $\frac{\Delta n}{\Delta x}$ sont entachées d'erreurs de signe opposé.

L'influence des facteurs régissant les gradients de conductivité peut également être précisée à l'aide des notations adoptées en 1946 par Svensson pour l'établissement des équations généralisées (10) et (11) [106].

Dans ce nouveau système, l'équivalent de la formule (10) [106] peut être établi en posant :

$$z = z_1 \text{ et } z - \Delta z = z_2$$

A partir de l'équation (11) [106], tenant compte de la mobilité U'' du colloïde en dessous de la frontière, on obtient alors :

$$\frac{\varkappa_2}{\varkappa_1} = \frac{U_{12}}{U_{11}} \left[1 - \frac{C}{\sum \frac{C_{i1}\, U_{i1}}{U_{i1} - \bar{U}}} \right] \qquad ((23)\ [106])$$

expression dans laquelle l'introduction de $\bar{U}$ représentant la mobilité qu'aurait le colloïde au-dessus de la frontière est un artifice de simplification. La valeur fictive de $\bar{U}$ est tirée de l'équation (12) [106], $\frac{\bar{U}}{U''} = \frac{u_1}{u_2}$: elle est fournie par :

$$\bar{U} = U'' \cdot \frac{u_1}{u_2}$$

L'équation (23) [106] rend compte de l'influence de la charge de l'ion principal et de la fonction B ($\bar{U}$) sur le rapport de conductivité.

1. Avec les colloïdes faible charge spécifique $\frac{Z}{M}$ F, la concentration équivalente $C = \frac{Z}{M} C_1$ sera également faible. Pratiquement, pour diminuer C on est limité par le pouvoir de résolution optique de l'appareil (trop faible Δn n).

2. L'étude graphique de la fonction hyperbolique :

$$B(\bar{U}) = \sum \frac{C_{i1}\, U_{i1}}{U_{i1} - \bar{U}} \qquad ((24)\ [106])$$

nous apprend que la concentration C_{i1} des ions du tampon doit être aussi grande possible et que la mobilité u_i des ions de même signe

que l'ion principal doit avoir une valeur aussi proche que possible de la mobilité $\bar{U}$ de cet ion, afin d'obtenir une valeur $|B(\bar{U})|$ aussi grande que possible.

Dans ces conditions, le rapport $\frac{C}{B(\bar{U})}$ devient très petit et le rapport de conductivité tend à se rapprocher du rapport de mobilité (absence d'anomalies).

Les tableaux II et III résument les variations de la fonction $B(\bar{U})$ dans le cas de l'électrophorèse d'un colloïde en présence d'un tampon constitué par un seul type d'anion 1 et de cation 2, c'est-à-dire par un seul sel. L'équation (24) [106] prend alors la forme :

$$B(\bar{U}) = \frac{c_{11}\,u_{11}}{u_{11}-\bar{U}} + \frac{c_{21}\,u_{21}}{u_{21}-\bar{U}} = \frac{c_{11}}{1-\frac{\bar{U}}{u_{11}}} + \frac{c_{21}}{1-\frac{\bar{U}}{u_{21}}}$$

En posant :

$$u_{11} \leq 0\ ;\ c_{11} \leq 0\ ;\ u_{21} \geq 0\ ;\ c_{21} \geq 0\ ;\ |c_{11}| = |c_{21}|$$

On voit que :

$$\begin{cases} \text{Si} \quad u_{11} \longrightarrow -\infty \ , \ B(\bar{U}) \longrightarrow c_{11} \\ \text{Si} \quad u_{11} \longrightarrow \bar{U} \ , \ B(\bar{U}) \longrightarrow -\infty \\ \text{Si} \quad \bar{U} \longleftarrow u_{11} \ , \ B(\bar{U}) \longrightarrow +\infty \\ \text{Si} \quad u_{11} = 0 \ , \ B(\bar{U}) = 0 \end{cases}$$

$$\begin{cases} \text{Si} \quad u_{21} \longrightarrow +\infty \ , \ B(\bar{U}) \longrightarrow c_{21} \\ \text{Si} \quad \bar{U} \longleftarrow u_{21} \ , \ B(\bar{U}) \longrightarrow +\infty \\ \text{Si} \quad u_{21} \longrightarrow \bar{U} \ , \ B(\bar{U}) \longrightarrow -\infty \\ \text{Si} \quad u_{21} = 0 \ , \ B(\bar{U}) = 0 \end{cases}$$

La représentation graphique est donnée par la figure 4. Comme on peut s'en rendre compte immédiatement par l'examen de cette figure, pour un sel tampon possédant un anion de plus faible mobilité que le cation, la fonction $B(\bar{U})$ aura une valeur plus grande quand la mobilité $\bar{U}$ aura une valeur négative (anion).

Nous avons vu (cf. (23) [106]) que le rapport des conductivités tend à se rapprocher du rapport des mobilités quand la mobilité $\bar{U}$ du colloïde et celle de l'ion tampon de même signe u_{11} ont la même valeur dans le même milieu (dans le cas présent, milieu 1 : au-dessus de la frontière). A pH = 6,5, et dans le cas d'une protéine de point isoélectrique supérieur à cette valeur, l'anion cacodylique est pratiquement le seul à permettre de se rapprocher de telles conditions.

Examinons maintenant les conditions nécessaires pour que la mobilité de la frontière représente bien celle du colloïde.

Considérons l'ion colloïdal de mobilité U_1 au-dessus de la frontière et de mobilité U_2 au-dessous. Désignons respectivement par C_1 et C_2 sa concentration au-dessus et au-dessous de la frontière. Désignons enfin par U' et U'' la mobilité de la frontière calculée à partir des milieux 1 (χ_1) et 2 (χ_2).

Si la mobilité de la frontière observée représente bien celle du colloïde, on doit avoir $U_1 = U'$ ou $U_2 = U''$.

TABLEAU II

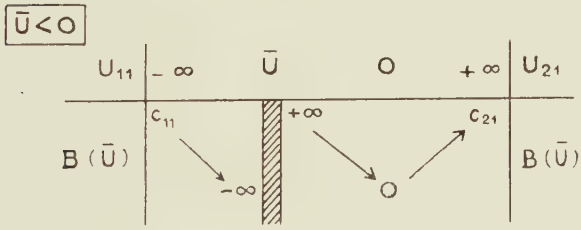
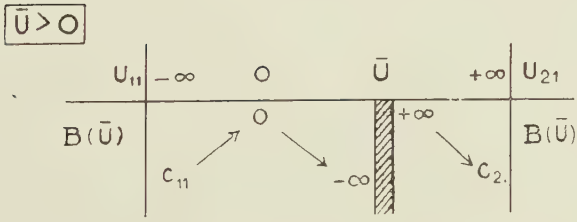


TABLEAU III



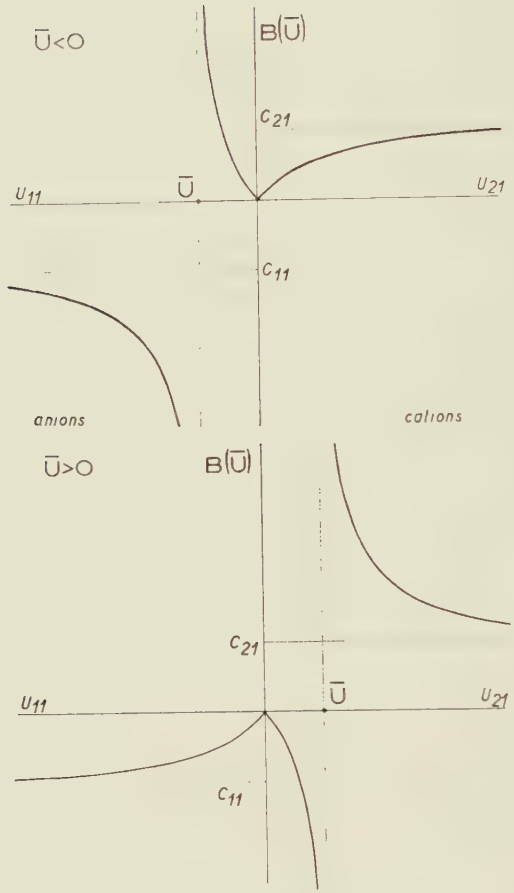


FIGURE 4. — Représentation graphique de la fonction $B(\bar{U})$

En posant, par exemple, $U_2 = U''$, on constate d'après l'équation (9) [106] que $U_1 = U'$ ou que $C_1 = 0$.

1° Dans l'éventualité $U_1 = U'$, l'équation (11) [106] permet d'écrire :

$$\frac{\chi_2}{\chi_1} \quad \frac{u_{i2}}{u_{i1}}$$

Ce rapport est le même pour tous les ions ((12) [106]), ce qui implique d'après les équations (10) et (11) [106] que $c_{i1} = c_{i2}$ pour tous les ions qui n'ont pas une mobilité identique à celle de la frontière, y compris l'ion compensateur du colloïde. Or, l'ion colloïdal ne peut pas à lui seul avoir un incrément de concentration. De ce fait, la solution $U_1 = U'$ est impossible : il n'y a pas de frontière.

2° Dès lors, l'éventualité $C_1 = 0$ est seule compatible avec l'existence d'une frontière de mobilité identique à celle du colloïde. Si l'on avait choisi $U_1 = U'$ à la place de $U_2 = U''$, on aurait été amené à admettre de la même manière $C_2 = 0$.

Svensson en tire la loi suivante :

« l'ion étudié doit être absent d'un côté de la frontière et sa mobilité doit être calculée à partir de la conductivité de la couche le renfermant ».

En ce qui concerne l'électrophorèse des colloïdes on doit adopter $C_1 = 0$ pour répondre aux conditions d'équilibre hydrostatique de deux liquides considérés comme non miscibles et ayant des densités différentes (solution de plus grande densité au fond de la cellule).

Si ces conditions ne sont pas remplies (frontière résultant de la superposition de veines liquides renfermant le même ion, colloïdal ou non, à deux concentrations différentes), on a : $U_1 - U' \neq 0$ et $U_2 - U'' \neq 0$. De telles frontières, de mobilité différente de celle de l'ion principal ont été désignées par Longsworth [70] et par Svensson [105bis] sous le terme de « false boundaries » adopté par l'ensemble des auteurs de langue anglaise et que nous traduirons par « frontières anormales ».

Comme $U_1 - U'$ et $U_2 - U'' \neq 0$, on peut diviser par ces différences le membre de droite des équations (10) et (11) [106] et faire apparaître de ce fait la fonction :

$$B(U') = \sum \frac{C_2 U_2}{U_1 - U'}, \quad \text{se rapportant à la frontière de mobilité } U'$$

et la fonction :

$$B(U'') = \sum \frac{C_1 U_1}{U_2 - U''}, \quad \text{se rapportant à la frontière de mobilité } U''.$$

Comme les équations (10) et (11) [106] sont symétriques, il suffit de traiter l'une d'entre elles : choisissons l'équation (11) [106].

On peut l'écrire sous la forme suivante pour un ion i :

$$\sum (c_{i2} - c_{i1}) = \left(\frac{x_2}{x_1} - \frac{U_{i2}}{U_{i1}}\right) \sum \frac{c_{i1} U_{i1}}{U_{i2} - U''} \qquad ((17)\ [106])$$

D'après la loi de l'électroneutralité, $\Sigma (c_{i2} - c_{i1}) = 0$, et de ce fait la fonction $B(U'') = 0$.

Si $i = n$, la fonction qui représente un polynome de degré $n - 1$ aura donc $(n - 1)$ racines. En d'autres termes, si $i = n$, il y

aura (n — 1) frontières anormales. La valeur de ces racines définit la mobilité de ces frontières anormales.

Si $n = 2$, $$B(U'') = \frac{C_{11}\ U_{11}}{U_{12}-U''} + \frac{C_{21}\ U_{21}}{U_{22}-U''} = 0$$

Le tableau IV résume les variations de cette fonction.

TABLEAU IV

U''	$-\infty$		U_{12}		0		U_{22}		$+\infty$
$B(U'')$	$+\varepsilon$	↗	$+\infty$ ‖ $-\infty$	↗	0	↗	$+\infty$ ‖ $-\infty$	↗	$-\varepsilon$

Si $n = 3$, $$B(U'') = \frac{C_{11}\ U_{11}}{U_{12}-U''} + \frac{C_{21}\ U_{21}}{U_{22}-U''} + \frac{C_{31}\ U_{31}}{U_{32}-U''} = 0$$

(1 = anion ; 2 et 3 = cations par exemple).

Le tableau V résume les variations de cette fonction.

TABLEAU V

U''	$-\infty$		U_{12}		0		U_{22}		x''		U_{32}		$+\infty$
$B(U'')$	$+\varepsilon$	↗	$+\infty$ ‖ $-\infty$	↗	0	↗	$+\infty$ ‖ $-\infty$	↗	0	↗	$+\infty$ ‖ $-\infty$	↗	$-\varepsilon$

La deuxième racine x″ de ce polynome du second degré est égale à :

$$x'' = \frac{C_{11}U_{12}U_{32} + C_{11}U_{12}U_{32} + C_{21}U_{22}U_{12} + C_{21}U_{22}U_{32} + C_{31}U_{32}U_{12} + C_{31}U_{32}U_{22}}{C_{11}U_{11} + C_{21}U_{21} + C_{31}U_{31}}$$

Pour simplifier, on peut retrancher une valeur nulle (électroneutralité) :

$$(C_{11} + C_{21} + C_{31})(U_{22}U_{32} + U_{12}U_{32} + U_{12}U_{22}) = 0$$

ce qui donne :

$$x'' = -\frac{C_{11}U_{22}U_{32} + C_{21}U_{12}U_{32} + C_{31}U_{12}U_{22}}{C_{11}U_{11} + C_{21}U_{21} + C_{31}U_{31}}$$

La figure 5 montre la représentation graphique de ces deux polynomes. La frontière anormale de mobilité 0 correspond au gradient ∂. Si le colloïde ne se trouve que d'un seul côté de la frontière mobile, ce n'est qu'à partir d'un système tampon à trois ions qu'apparaît une frontière mobile anormale de mobilité x″.

Il a été établi que chaque ion i change de concentration au niveau de chaque frontière (cf. (9) [106]). On peut écrire cette équation sous une forme encore plus générale, Svensson introduit

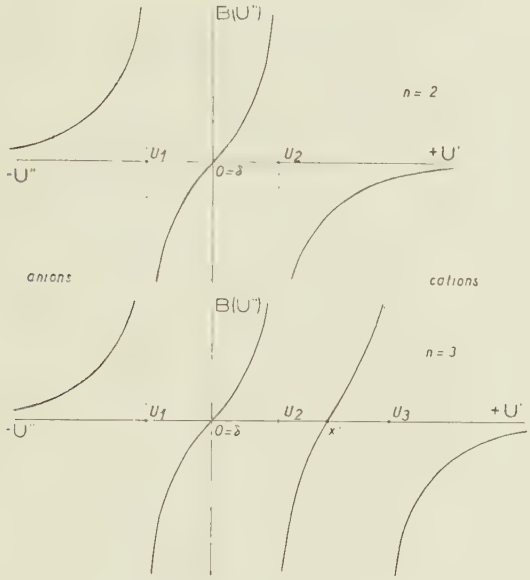


Figure 5. — Représentation graphique de la fonction B(U'')

un nouvel indice j pour désigner la couche liquide. Dans le cas de n ions, j aura une valeur allant de 1 à n. Cet indice désigne également la frontière. Dans le cas de n ions, j aura une valeur allant de 1 à (n — 1).

L'équation ((9) [106]) peut s'écrire :

$$c_{i1} \varkappa_2 (u_{i1} - U') = c_{i2} \varkappa_1 (u_{i2} - U'')$$

Si le milieu 1 est représenté par la couche liquide j, et le milieu 2 par la couche liquide j + 1, la frontière séparant ces deux couches sera appelée j (fig. 6). On a donc :

$$c_{ij} \varkappa_{j+1} (u_{ij} - U'_j) = c_{i,j+1} \varkappa_j (u_{i,j+1} - U''_j)$$

Si i va de 1 à n, on aboutit à :

$$c_{i1} \varkappa_n \prod_1^{n-1} (u_{ij} - U'_j) = c_{in} \varkappa_1 \prod_1^{n-1} (u_{i,j+1} - U''_j) \qquad ((26)\ [106])$$

Ainsi, au cours d'une électrophorèse, la concentration de la fraction la plus rapide de la branche ascendante change non

seulement au niveau de sa propre frontière, mais également au niveau de toutes les autres y compris de δ. De même, la concentration de la fraction la plus lente de la branche descendante change au niveau de sa propre frontière et au niveau de toutes les autres, hormis la frontière ε qui se trouve au-dessus. On conçoit dès lors

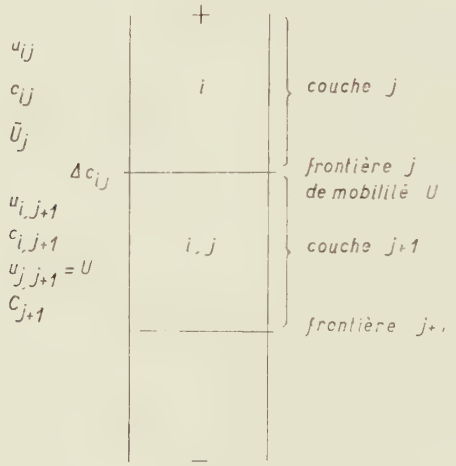


FIGURE 6. — Disposition et nomenclature des ions situés dans une branche de la cuve à électrophorèse

que le gradient de réfraction soit plus important au niveau de la frontière δ (gradients colloïdal et salin) qu'au niveau du gradient ε (gradient salin seul).

Au niveau de toutes les frontières mobiles, il apparaît donc des gradients colloïdaux et salins superposés. Ces gradients sont responsables notamment des erreurs de calcul de concentration et s'avèrent proportionnels aux gradients de conductivité.

Ils peuvent être calculés à partir de l'équation (7) [105]. Ainsi le gradient de concentration d'un ion i au niveau d'une frontière j est calculé d'après l'équation :

$$\frac{\Delta C_{ij}}{C_{ij}} = \frac{\dfrac{\Delta \varkappa}{\varkappa} - \dfrac{\Delta U_{ij}}{U_{ij}}}{1 + \dfrac{\Delta U_{ij}}{U_{ij}} - \dfrac{U_{j,j+1}}{U_{ij}}} \qquad ((15)\ [105])$$

L'étude de cette fonction peut se résumer dans les tableaux VI et VII. On remarque que le gradient de concentration est égal au

gradient de conductivité pour des écarts de mobilités infinis. La figure 7 montre la représentation graphique de cette fonction.

Si $\frac{\Delta C_{ij}}{C_{ij}} > 0$, ce gradient est superposé aux gradients des frontières descendantes plus rapides que i ; il les augmente.

Si $\frac{\Delta C_{ij}}{C_{ij}} < 0$, il est superposé aux gradients des frontières ascendantes plus lentes que i ; il les diminue.

TABLEAU VI

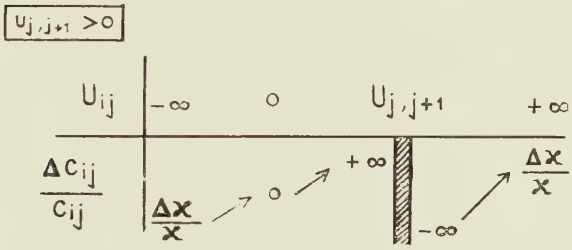
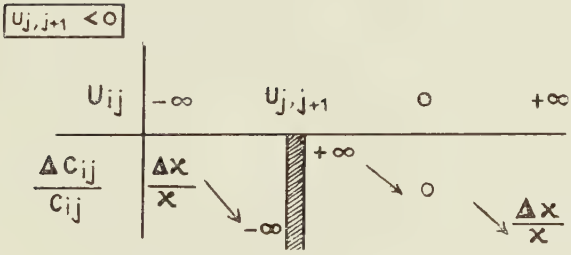


TABLEAU VII



Il apparaît que la correction à apporter sera d'autant plus importante que les frontières seront plus rapprochées. La valeur du gradient de concentration se rapproche de celle du gradient de conductivité pour des écarts de mobilité infinis.

Cette fonction est valable aussi bien pour les ions colloïdaux que pour les ions salins.

Analysons maintenant l'erreur apportée par les gradients d'ions salins.

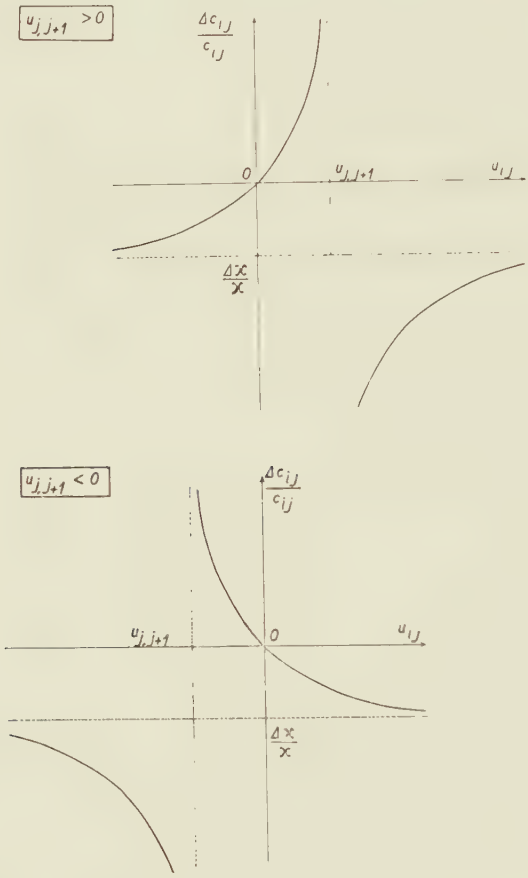


FIGURE 7. — Expression graphique du gradient superposé $\Delta C_{ij}/C_{ij}$ au niveau de la frontière j

Si nous transportons dans l'équation (11) [106] la valeur de $\frac{x_2}{x_1}$ déterminée au moyen de l'équation (23) [106] on obtient :

$$(C_{i2} - C_{i1})(U_{i2} - U'') = \left[\frac{U_{i2}}{U_{i1}}\left[1 - \frac{C}{\sum \frac{C_{i1} U_{i1}}{U_{i1} - \bar{U}}}\right] - \frac{U_{i2}}{U_{i1}}\right] C_{i1} U_{i1}$$

que l'on peut écrire avec la nouvelle notation :

$$\left(C_{i,j+1} - C_{ij}\right) = \Delta C_{ij} = \left[-\frac{C_{j+1}}{B_j(\bar{U}_j)} \cdot \frac{U_{i,j+1}}{U_{ij}}\right] \frac{C_{ij}\, U_{ij}}{U_{i,j+1} - U''}$$

L'équation (22) [106] permet d'écrire :

$$\bar{U} = \frac{U_{i1}}{U_{i2}} \cdot U \quad \text{ou} \quad U = \bar{U} \cdot \frac{U_{i2}}{U_{i1}}$$

de même :

$$U'' = \bar{U}_j \cdot \frac{U_{ij+1}}{U_{ij}}$$

$$\Delta c_{ij} = - \frac{C_{j+1}}{B_j(\bar{U}_j)} \cdot \frac{U_{ij+1}}{U_{ij}} \cdot \frac{c_{ij}\, U_{ij}}{U_{ij+1} - \bar{U}_j \dfrac{U_{ij+1}}{U_{ij}}}$$

$$\Delta c_{ij} = - \frac{C_{j+1}}{B_j(\bar{U}_j)} \cdot \frac{c_{ij}\, U_{ij}}{U_{ij} - \bar{U}_j} \qquad \text{((27) [106])}$$

Cette équation représente l'incrément de concentration d'un ion i au niveau d'une frontière mobile vraie j.

L'indice de réfraction de cet ion au niveau de cette frontière est représenté par le produit de l'incrément de concentration Δc_{ij} par l'incrément de l'indice de réfraction spécifique : $\frac{\partial n}{\partial c_i}$

$$\Delta n_{ij} = \Delta c_{ij} \left(\frac{\delta n}{\delta c_i} \right)$$

Nous pouvons représenter de la même manière l'indice de réfraction de l'ion colloïdal :

$$C_{j+1} \left(\frac{\delta n}{\delta C} \right)$$

L'erreur relative Q_i introduite par l'ion i est égale à :

$$Q_i = \frac{\Delta c_{ij} \left(\dfrac{\delta n}{\delta c_i} \right)}{C_{j+1} \left(\dfrac{\delta n}{\delta C} \right)}$$

Si l'on admet n constant pour tous les ions, on a :

$$Q_i = - \frac{1}{B_j(\bar{U}_j)} \cdot \frac{c_{ij}\, U_{ij}}{U_{ij} - \bar{U}_j} \left(\frac{\delta C}{\delta c_i} \right)_{n.\,\text{const.}} \qquad \text{((30) [106])}$$

En posant : $$\left(\frac{\delta C}{\delta c_i}\right)_{n.\,const.} = \frac{Z/M}{z_i/m_i} = r_i \qquad \text{((31) [106])}$$

$$\left.\begin{aligned} \frac{c_{ij}\ u_{ij}}{u_{ij} - \bar{U}_j} &= b_i \\ \sum b_i &= B(\bar{U}) \end{aligned}\right\} \qquad \text{((32) [106])}$$

on peut écrire pour l'ion i :

$$Q_i = -\frac{b_i r_i}{\sum b_i} \qquad \text{((33) [106])}$$

et pour tous les ions i :

$$Q = -\sum \frac{b_i\ r_i}{\Sigma\ b_i} \qquad \text{((34 [106])}$$

On conçoit d'après cette dernière équation que l'erreur introduite dans l'indice de réfraction d'une frontière par les ions colloïdaux superposés soit plus importante que celle introduite par les gradients superposés d'ions salins.

En effet, l'analyse des valeurs de b_i et r_i montre que :

1° *Pour les ions du tampon,*

r_i est petit : la charge spécifique Z/M de l'ion principal (colloïde) est très inférieure à la charge spécifique z_i/m_i des ions environnants (tampon).

b_i est assez grand : le produit $c_{ij}\ u_{ij}$ est nettement supérieur à la différence $u_{ij} - \bar{U}_j$.

2° *Pour les ions colloïdaux,*

r_i est grand : il est voisin de l'unité, puisqu'il s'agit du rapport entre la charge spécifique du colloïde principal et de celle du colloïde environnant.

b_i peut être très grand car la différence entre la mobilité du colloïde environnant et celle du colloïde principal peut être presque nulle.

Il ressort donc que $Q_{coll.} > Q_{tamp.}$

L'étude des signes de l'équation (27) [106] nous indique dans quel sens les ions environnants colloïdaux et du tampon modifient le gradient de réfraction de l'ion principal.

Nous admettrons le cas le plus général où la mobilité des ions du tampon est plus grande que celle du colloïde. De ce fait, la fonction B ($\bar{U}$) est de même signe que l'ion colloïdal ; en d'autres termes, B_j ($\bar{U}_j$) et C_{j+1} sont de même signe. Il s'en suit que

$\Delta c_{ij}/c_{ij}$ dans l'équation (27) [106] est de signe opposé à $u_{ij}/u_{ij} - \bar{U}_j$:

$$\frac{\Delta c_{ij}}{c_{ij}} = - \frac{C_{j+1}}{B_j(\bar{U}_j)} \cdot \frac{u_{ij}}{u_{ij} - \bar{U}_j} \qquad ((27)\ [106])$$

Svensson ayant adopté conventionnellement $U_{desc} > 0$, nous pouvons avoir :

1° Branche positive ascendante : $0 > \bar{U}_j > u_{ij}$ où $|u_{ij}| > |\bar{U}_j|$, on a : $u_{ij}/u_{ij} - \bar{U}_j > 0$, donc $\Delta c_{ij}/c_{ij} < 0$.

2° Branche positive descendante : $\bar{U}_j > u_{ij} > 0$ où $|u_{ij}| < |\bar{U}_j|$, on a : $u_{ij}/u_{ij} - \bar{U}_j < 0$, donc $\Delta c_{ij}/c_{ij} > 0$.

3° Branche positive à la fois ascendante et descendante : $u_{ij} < 0$; $\bar{U}_j > 0$ où u_{ij} et $\bar{U}_j$ sont de signe contraire. On a : $u_{ij}/u_{ij} - \bar{U}_j > 0$, donc $\Delta c_{ij}/c_{ij} < 0$.

Le gradient superposé $\Delta c_{ij}/c_{ij}$ a déjà été étudié en fonction de la mobilité de l'ion principal $U_{j,\,j+1}$ en dessous de la frontière j ((15) [105]). Ici, il est étudié en fonction de la mobilité de l'ion principal au-dessus de la frontière : l'élimination de $\Delta \varkappa/\varkappa$ qui en résulte rend sa valeur indéterminé quand $u_{ij} \longrightarrow \pm \infty$.

Svensson résume ainsi l'étude de $\Delta c_{ij}/c_{ij}$: « l'incrément de l'indice de réfraction donné par l'ion principal est augmenté par les ions environnants de même charge s'ils sont plus lents, diminué s'ils sont plus rapides ou de charge opposée ».

Considérons par exemple, l'électrophorèse de deux colloïdes.

Les ions du colloïde le plus lent de la branche ascendante sont environnés par les ions du colloïde le plus rapide. De ce fait, leur frontière comporte un gradient superposé négatif : son gradient de réfraction est diminué. Les ions du colloïde le plus rapide sont environnés par des ions du tampon plus rapides,, le même phénomène se produit, mais plus faiblement comme le montre l'étude de Qi.

Dans la branche descendante, les ions du colloïde le plus rapide sont environnés par les plus lents ; leur frontière comporte donc un gradient superposé positif : leur gradient de réfraction est augmenté.

En définitive, la proportion apparente du colloïde le plus rapide est augmenté dans les deux branches.

Comme d'une part, le gradient de réfraction dépend plus des concentrations protéiques que des concentrations salines mises en jeu et, comme d'autre part, la conductivité est déterminée surtout

par les sels, on comprend dès lors que les enregistrements $-\frac{\Delta \varkappa}{\varkappa} = f(x)$ et $\frac{\Delta n}{x} = f(x)$ ne soient pas identiques du point de vue quantitatif. Néanmoins, la dérivée de ces deux fonctions change de signe à la même abcisse x ; en d'autres termes, ces deux enregistrements traduisent les mêmes accidents avec des intensités différentes.

La figure 8 donne une représentation schématique d'une électrophorèse de deux constituants 1 et 2 en quantités égales.

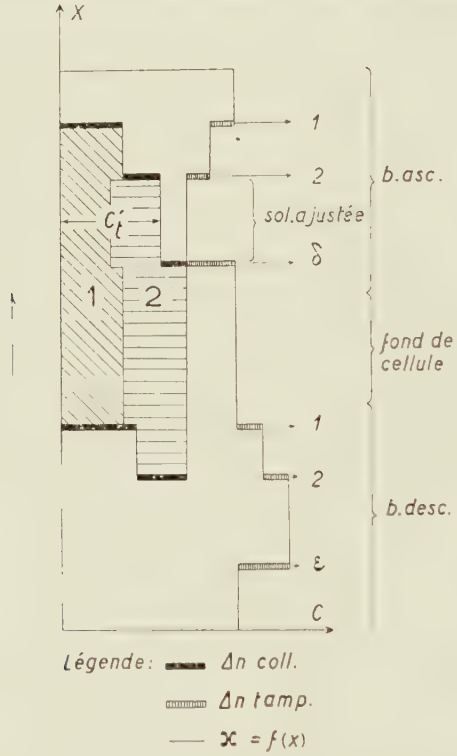


FIGURE 8. — Représentation schématique d'une électrophorèse de deux colloïdes 1 et 2, ne tenant compte que des gradients colloïdaux superposés. Le gradient réfractométrique des diverses frontières a pour valeur la somme des gradients réfractométriques Δn colloïdaux et salins (sol. tampon). Sur le schéma, ces derniers sont déduits du « profil » conductimétrique de la veine liquide X

II. – Système de correction proposé par Hoch [42], [44], [15]

On ne peut pas connaître avec exactitude les variations de mobilité des ions à travers une frontière mobile. De ce fait le calcul des proportions vraies et des mobilités relatives des

constituants à partir de la théorie précédente ne peut être qu'approximatif.

Il est possible cependant de lever cette difficulté en mettant en jeu un facteur expérimental.

Johnston et Ogston [53] avaient déjà montré en 1946 que les changements de concentration survenant au cours de l'ultracentrifugation de deux constituants indépendants pouvaient être rattachés à des phénomènes purement physiques. Il s'agit, en effet, d'anomalies de frontière ayant trait à des changements de concentration du constituant lent dus à des différences dans la vitesse de sédimentation de ce dernier en présence et en l'absence du constituant rapide, le composant lent (couche supérieure) paraissant augmenté.

Le mérite de Hoch est d'avoir adapté un raisonnement analogue au cas des anomalies de frontière en électrophorèse.

Rappelons que, d'après Svensson, deux frontières donnent lieu à un gradient superposé négatif sur la plus lente dans la branche ascendante et positif sur la plus rapide dans la branche descendante.

Ainsi dans la branche ascendante, par exemple, la concentration réelle du constituant rapide 1 ou plus exactement la proportion de 1 dans la solution « ajustée » 2 est apparemment augmentée dans la solution 1. Tout se passe comme si, entre les frontières 1 et 2, le constituant 1 augmentait sa concentration pour équilibrer le décrément de sa vitesse de migration.

A. — Définition du facteur expérimental :

Si le changement relatif de la vélocité d'un ion colloïdal déterminé par un changement de concentration de 0 à C_i est proportionnel à la concentration du colloïde tel que :

$$\frac{Va_i - V_i}{V_i} = K_i C_i \qquad ((1)\ [42])$$

l'incrément relatif K_i de la vélocité par unité de concentration va permettre à partir de Va_i (vélocité de la frontière) de déterminer V_i à la concentration $C_i = 0$ (vélocité de l'ion i au-dessus de la frontière). Un tel incrément tient compte à la fois des variations de champ électrique (conductivité $\varkappa$) et de mobilité U.

1er cas : En supposant que $(\frac{U_{i2}}{U_{i1}})$ coll. $= (\frac{U_{i2}}{U_{i1}})$ tamp. ((12) [106]), il est possible d'utiliser l'équation (23) [106] et de l'écrire sous la forme :

$$\frac{Va_i - V_i}{V_i} = \frac{C}{B(\bar{U}) - C} \qquad \text{en posant :} \qquad Va_i = \frac{U_{i2}\, i}{\varkappa_2},\ V_i = \frac{U_{i1}\, i}{\varkappa_1}$$

Si C est petit par rapport à B ($\bar{U}$), comme tel est le cas des protéines (faible charge spécifique), l'équation (1) [42] permet d'écrire (fig. 9) :

$$K_i = \frac{1}{V_i} \cdot \frac{Va_i - V_i}{C_i} \simeq \left(\frac{1}{V_i} \cdot \frac{d\,Va_i}{d\,C_i}\right)_{C_i \to 0}$$

L'extrapolation pour déterminer V_i à $C_i = 0$ est dès lors possible (dérivée à l'origine). On conçoit que K_i varie peu si la concentration protéique C_i ne prend que des valeurs faibles.

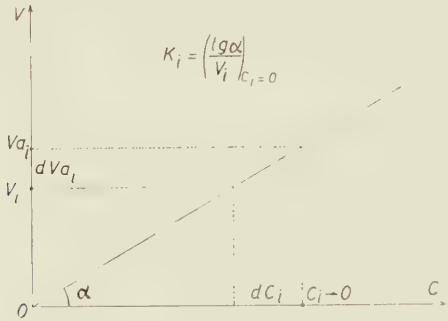


FIGURE 9. — Définition algébrique du facteur K_i

2me *cas :* Si l'on pose :

$$\left(\frac{U_{i2}}{U_{i1}}\right)_{coll.} = \frac{U}{U_1} \simeq \frac{U_2}{U_1} = \left(\frac{U_{i2}}{U_{i1}}\right)_{tamp.}$$

on peut établir l'égalité suivante en introduisant un coefficient *a* :

$$\frac{U_1}{U}\left(1 + aC\right) = \frac{U_1}{U_2} = \frac{\bar{U}}{U} \qquad \text{((2) [44])}$$

En introduisant ce produit dans l'équation (21) [106] on obtient une nouvelle valeur de K :

$$K = \frac{1}{C'_1} \cdot \frac{(1 + a\Sigma)C}{\Sigma - C} \qquad \text{où :} \qquad \Sigma = \sum \frac{C_{i1} U_{i1}}{U_{i1} - U_1(1 + aC)}$$

Application : La détermination expérimentale de K_i rend possible le calcul de la charge de l'ion protéique i par exemple. En effet :

$$C_{\text{équiv./ml.}} = \frac{Z}{M} \cdot C_1 \; 10^{-2} = Qs \; 10^{-2} \cdot C_1$$

où $Qs = \frac{Z}{M}$ = charge spécifique.

C_1 = concentration exprimée en g. p. 100 ml.

Ainsi, dans le premier des deux cas précédemment envisagés, on peut écrire :

$$\frac{V_{ai} - V_i}{V_i} = \frac{Q_s \cdot C_1 \cdot 10^{-2}}{B(\bar{U}) - C}$$

$$\frac{V_{ai} - V_i}{V_i} \cdot \frac{1}{c_i} = K = \frac{Q_s \cdot 10^{-2}}{B(\bar{U}) - C} \qquad (4 \text{ a } [42])$$

$$\text{d'où : } Q_s \cdot 10^{-2} \backsim K \left[B(\bar{U}) \right]$$

dans le second cas :

$$K = \frac{(1 + a\Sigma)\ Q_s \cdot 10^{-2}}{\Sigma - Q_s \cdot 10^{-2} \cdot C'_1}$$

$$\text{d'où : } Q_s \cdot 10^{-2} = K \frac{\dfrac{c_{i1} u_{i1}}{u_{i1} - U_1} \cdot \dfrac{1}{1 + ac}}{1 + a \dfrac{c_{i1} u_{i1}}{u_{i1} - U_1 (1 + aC)}\ KC'_1}$$

Selon que $a \cdot \frac{c_{i1}\ u_{i1}}{u_{i1} - U_1} \cdot \frac{1}{1 + ac}$ sera négatif ou positif, la valeur obtenue pour $Q_s \cdot 10^{-2}$ sera plus grande ou plus petite que celle obtenue dans le cas présent.

Cette méthode est indépendante de l'adsorption des petits ions sur le colloïde, de plus elle présente l'avantage de ne pas avoir recours aux activités. Il n'est pas nécessaire d'obtenir un équilibre de Donnan complet ([106], p. 115 et [42] p. 187).

Détermination du facteur K :

On suppose que K est le même pour toutes les fractions électrophorétiques de la même protéine.

Il représente l'incrément relatif de la vélocité par unité de concentration, ce qui signifie que, si pour une augmentation de concentration de 1 g. p. 100 ml. la vélocité subit un accroissement de 10 %, la valeur de K sera de 0,1.

$$K = \frac{1}{c_i} \cdot \frac{V_{ai} - V_i}{V_i} = \frac{10}{100} = 0{,}1$$

1° Dans le cas d'une protéine électrophorétiquement peu dispersée comme l'albumine ou l'hémoglobine, on peut calculer K en comparant les distances parcourues dans la branche ascendante à différentes concentrations. Ces expériences doivent être conduites successivement avec des échantillons provenant de la même dialyse et le même jour.

2° Une autre méthode comparative permet d'effectuer deux mesures au cours de la même électrophorèse. Cette expérimentation nécessite deux conditions :

— *Absence de la frontière ∂ :*

On sait que la frontière ∂ représente une limite de séparation entre le mélange colloïde-tampon initial et le mélange colloïde-tampon ayant subi l'ajustement automatique de conductivité en migrant dans le tampon seul (solution « ajustée »). En d'autres termes, la frontière ∂ représente la limite de séparation entre deux milieux de fonction B de Kohlrausch différentes. La solution « ajustée » remise en électrophorèse contre la même préparation de tampon ne peut donc présenter un nouveau ∂, sa fonction B étant la même que celle du tampon.

— *Faible concentration protéique :*

Dans ce cas, les changements de concentration des ions tampons au niveau de la frontière ascendante sont proportionnels à la concentration protéique.

L'expérience se conduit comme suit :

On dispose de bas en haut dans la branche ascendante d'une cuve à l'électrophorèse : la solution protéique de concentration C'conc., la même solution protéique de concentration C'dil. qui a subi l'ajustement conductimétrique au cours d'une électrophorèse antérieure, et, enfin la solution tampon. On détermine la vélocité des deux frontières ainsi formées.

Bien que la vélocité V'conc. de la frontière : solution concentrée/solution diluée ne représente pas la vitesse de migration de la protéine puisque les ions protéiques sont situés de part et d'autre de la frontière (cf. p. 31), on admet, du fait de l'absence du gradient ∂ et par là de l'absence d'un changement de concentration ionique dans la veine liquide diluée, que la relation unissant les vitesses respectives des frontières est proportionnelle à la différence des concentrations protéiques des milieux qu'elles délimitent.

Mais la détermination de cette relation est compliquée par le fait que la vitesse de migration de la frontière : solution concentrée/solution diluée — nécessairement supérieure à celle de la frontière : solution diluée/solution tampon est entachée d'erreur par excès. La correction à apporter à l'incrément relatif de vitesse par unité de concentration (facteur K, précédemment défini) est déterminée selon le principe de calcul suivant :

Soit r le rapport de la vélocité de l'ion protéique à dilution infinie dans le tampon seul à celle obtenue à dilution infinie au-dessous du gradient ε :

$$\frac{V'asc.}{V'desc.} = r\,;\ V' = rV$$

Puisque : $V'conc. = r\,(V_1 + V_1K_1C'conc.)$

et que : $V'dil. = r\,(V_1 + V_1K_1C'dil.)$,

la distance qui sépare les deux frontières par unité de distance et de temps est de :

$$V'conc. - V'dil. = r\,[V_1 + V_1\,K_1\,C'conc.] - r\,[V_1 + V_1\,K_1\,C'dil.]$$
$$= r\,V_1\,K_1\,(C'conc. - C'dil.)$$

Autrement dit, le volume par unité de section, c'est-à-dire la longueur initiale de la veine diluée, a été réduite de :

$$rV_1K_1\,(C'conc. - C'dil.)$$

correspondant à une quantité de protéine égale à :

$$rV_1K_1\,(C'conc. - C'dil.)\ C'dil.$$

Cette quantité retranchée de la veine diluée est passée dans la veine concentrée. Les concentrations C'conc. et C'dil demeurant constantes, cet apport se traduit par une augmentation de volume de la veine concentrée égale à :

$$S = \frac{rV_1K_1\,(C'conc. - C'dil.)\ C'dil.}{C'conc. - C'dil.} = rV_1K_1\,C'dil$$

En définitive, la longueur (volume/unité de section) de la veine concentrée se trouve augmentée de cette quantité (fig. 10) qui, par unité de distance parcourue, est égale à :

$$\frac{rV_1K_1\,C'dil.}{V'dil.} = \frac{rV_1K_1\,C'dil.}{rV_1(1+K_1C'dil.)} \simeq K_1\,C'dil.$$

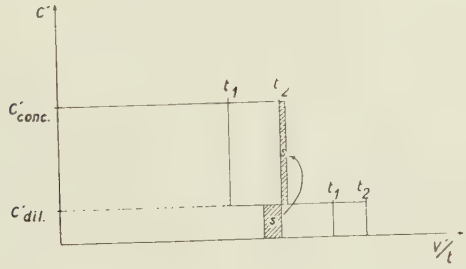


FIGURE 10. — Electrophorèse simultanée d'un même colloïde à deux concentrations différentes. La frontière « concentrée » en migrant plus vite que la frontière « diluée » s'est enrichie au détriment de cette dernière de la quantité *s*

En tenant compte de ce terme de correction, le facteur expérimental K a pour valeur :

$$K = \frac{V'conc. - V'dil. - K_1 C'dil. \; V'dil.}{V'dil. \; (C'conc - C'dil.)}$$

B. Principe du calcul :

Etablissons le bilan de la quantité du constituant 1 qui passe du milieu 2 (solution ajustée) dans le milieu 1 (Solution tampon). Ce bilan peut être calculé aussi bien à partir du milieu 1 que du milieu 2.

Choisissons la branche ascendante et exprimons les quantités par unité de section et de temps.

1° *Dans le milieu 2 :*

— la vitesse observée de l'ion rapide est égale à :

$$Va'_{1,2} = V_1 \; (1 + KC'_t)$$

— la quantité totale de 1 dans ce milieu est donc égale à :

$$V'a_{1,2} \, C'_1 = V_1 (1 + KC'_t) \, C'_1$$

— la vitesse observée de l'ion lent 2 est égale à :

$$V'a_2 = V_2 \; (1 + KC'_t)$$

— la quantité de 1 demeurant en 2 est donc égale à :

$$V'a_2 \, C'_1 = V_2 \; (1 + KC'_t) C'_1$$

Finalement la quantité de 1 qui passe en 1 est égale à :

$$(V_1 - V_2) \; (1 + KC'_t) \; C'_1$$

2° *Dans le milieu 1 :*

— la vitesse observée de l'ion rapide 1 est égale à :

$$V'a_1 = V_1 \; (1 + KC'_1)$$

la quantité totale de 1 dans ce milieu est donc égale à :

$$V'a_1 \, C'_1 = V_1 \; (1 + KC'_1) C'_1$$

— la vitesse observée de l'ion lent 2 dans le milieu 2 est :

$$V'a_2 = V_2 \; (1 + KC'_t)$$

— la quantité de 1 demeurée en 2 est égale à :

$$V'_{a_2} C'_1 = V_2 \left(1 + KC'_t\right) C'_1$$

Finalement, la quantité de 1 qui est passée en 1 est égale à :

$$V_1 \left(1 + KC'_1\right) C'_1 - V_2 \left(1 + KC'_t\right) C'_1 = \left(V'_{a_1} - V'_{a_2}\right) C'_1$$

La séparation par unité de temps des deux frontières est donnée par :

$$S = V'_{a_1} - V'_{a_2} = V_1 \left(1 + KC'_1\right) - V_2 \left(1 + K_2 \mathbf{C}'_2 + K_1 \mathbf{C}'_1\right)$$

si l'on suppose que $K_1 = K_2$, et comme par définition : $C'_t = \mathbf{C}_2 + \mathbf{C}_1$, on peut écrire :

$$S = V_1 \left(1 + KC'_1\right) - V_2 \left(1 + KC'_t\right)$$

On peut donc exprimer cette dernière quantité par :

$$\left(V'_{a_1} - V'_{a_2}\right) C'_1 = S C'_1$$

et écrire l'égalité :

$$S C'_1 = \left(V_1 - V_2\right) \left(1 + KC'_t\right) \mathbf{C}'_1$$

l'écart des vélocités réelles est donc de :

$$V_1 - V_2 = S \frac{C'_1}{\mathbf{C}'_1} \cdot \frac{1}{1 + KC'_t} \qquad \text{((6), [44])}$$

On peut écrire également S sous la forme :

$$S = V_1 \left(1 + KC'_1\right) - V_2 \left(1 + KC'_t\right) = \left(V_1 - V_2\right) \left(1 + KC'_t\right) C'_1 - V_1 K \left(C'_t - C'_1\right) C'_1$$

Cette valeur introduite dans (6) [44] permet d'extraire $\mathbf{C}'_1$:

$$\mathbf{C}'_1 = \frac{\left(V_1 - V_2\right) \left(1 + KC'_t\right) C_1 - V_1 K \left(C'_t - C'_1\right) C'_1}{\left(V_1 - V_2\right) \left(1 + KC'_t\right)}$$

$$\mathbf{C}'_1 = C'_1 - \frac{V_1 K \left(C'_t - C'_1\right) C'_1}{\left(V_1 - V_2\right) \left(1 + KC'_t\right)} \qquad \text{((5), [44])}$$

Si nous introduisons maintenant la valeur de $(V_1 - V_2)$ dans cette dernière équation, nous obtenons la valeur $\mathbf{C}'_1$ à partir des données expérimentales :

$$\mathbf{C}'_1 = C'_1 - \frac{V_1 K \left(C'_t - C'_1\right) C'_1}{S \frac{C'_1}{\mathbf{C}'_1} \cdot \frac{1}{1 + KC'_t} \cdot 1 + KC'_t} = C'_1 - \frac{V_1 K \left(C'_t - C'_1\right) \mathbf{C}'_1}{S}$$

$$\mathbf{C}'_1 = C'_1 - \mathbf{C}'_1 \frac{V_1}{S} K (C'_f - C'_1)$$

$$C'_1 = \mathbf{C}'_1 + \mathbf{C}'_1 \frac{V_1}{S} K (C'_f - C'_1) = \mathbf{C}'_1 \left(1 + \frac{V_1}{S} K (C'_f - C'_1)\right)$$

$$\mathbf{C}'_1 = \frac{C'_1}{1 + \frac{V_1}{S} K (C'_f - C'_1)} \qquad ((7), [44])$$

— On sait que $V_1 = V'a_1/1 + KC'_1$

— On calcule d'abord la proportion réelle du constituant 1 au moyen de cette dernière équation (7) [44]

— On détermine alors la valeur du rapport $C'_1/\mathbf{C}'_1$ qui permet à l'aide de l'équation (6) [44] de calculer la différence relative de vélocité à concentration infiniment basse (différence relative de mobilité)

l'équation (6) [44] s'écrit alors :

$$\frac{V_1 - V_2}{V_1} = \frac{S}{V_1} \frac{C'_1}{\mathbf{C}'_1} \cdot \frac{1}{1 + KC'_f}$$

C. — Cas particuliers :

Nous terminerons cet exposé par l'étude de trois cas particuliers concernant deux fractions électrophorétiques de mobilités très voisines.

1° *Détermination de la concentration de la fraction supérieure.*

a) *Dans la branche ascendante :*

$$(V_1 - V_2)(1 + K_2 \mathbf{C}'_2 + K_1 \mathbf{C}'_1) \mathbf{C}'_1 = \left[V_1 (1 + K_1 C'_1) - V_2 (1 + K_2 \mathbf{C}'_2 + K_1 \mathbf{C}'_1)\right] C'_1$$

Si l'on pose : $\quad e = 1 + K_2 \mathbf{C}'_2 + K_1 \mathbf{C}'_1$

on a : $\quad (V_1 - V_2) e \, \mathbf{C}'_1 = C'_1 \left[V_1 (1 + K_1 C'_1) - V_2 e\right]$

que l'on peut écrire sous la forme d'un trinôme du second degré :

$$C'_1 V_1 + V_1 K_1 C'^2_1 - V_2 e \, C'_1 = (V_1 - V_2) e \, \mathbf{C}'_1$$

$$C'_1 + K_1 C'^2_1 = \frac{(V_1 - V_2) e \, \mathbf{C}'_1 + V_2 e \, C'_1}{V_1} = \left(1 - \frac{V_2}{V_1}\right) e \, \mathbf{C}'_1 + \frac{V_2}{V_1} e \, C'_1$$

$$K_1 C'^2_1 - \left(\frac{V_2}{V_1} e \, C'_1\right) + C'_1 - e \, \mathbf{C}'_1 \left(1 - \frac{V_2}{V_1}\right) = 0$$

$$K_1 C'^2_1 + \left(1 - \frac{V_2}{V_1} e\right) C'_1 - e \, \mathbf{C}'_1 \left(1 - \frac{V_2}{V_1}\right) = 0$$

d'où l'on tire C'_1 :

$$C'_1 = \frac{-\left(1-\frac{V_2}{V_1}e\right)+\left|\sqrt{\left(1-\frac{V_2}{V_1}e\right)^2+4K_1 e\,\mathfrak{C}'_1\left(1-\frac{V_2}{V_1}\right)}\right|}{2K_1} \qquad \text{((5), [42])}$$

b) *Dans la branche descendante :*

$$(V_2-V_1)(1+K_1\mathfrak{C}_1+K_2\mathfrak{C}_2)\mathfrak{C}_2=\left[V_2(1+K_2C_2)-V_1(1+K_1\mathfrak{C}_1+K_2\mathfrak{C}_2)\right]C_2$$

si l'on pose :

$$g = 1 + K_1\mathfrak{C}_1 + K_2\mathfrak{C}_2$$

on a :

$$(V_2-V_1)g\mathfrak{C}_2=C_2\left[V_2(1+K_2C_2)-V_1 g\right]=V_2K_2C_2^2+C_2V_2-V_1 g C_2$$

$$V_2K_2C_2^2+C_2V_2=V_1 g C_2-(V_1-V_2)\,g\,\mathfrak{C}_2$$

$$K_2C_2^2+C_2=\frac{V_1}{V_2}g\,C_2-g\,\mathfrak{C}_2\left(\frac{V_1}{V_2}-1\right)=0$$

$$K_2C_2^2-\left(\frac{V_1}{V_2}g-1\right)C_2+g\,\mathfrak{C}_2\left(\frac{V_1}{V_2}-1\right)=0$$

d'où l'on tire C_2 :

$$C_2=\frac{+\left(\frac{V_1}{V_2}g-1\right)-\left|\sqrt{\left(\frac{V_1}{V_2}g-1\right)^2-4K_2 g\,\mathfrak{C}_2\left(\frac{V_1}{V_2}-1\right)}\right|}{2K_2} \qquad \text{((7), [42])}$$

2° *Cas particuliers :*

1. — Si la différence relative des mobilités des constituants protéiques 1 et 2, $\frac{U_1-U_2}{U_2}$, est égale au changement relatif de la vitesse de migration de la protéine totale à travers la frontière $\frac{Va_i-Vi}{Vi}$, autrement dit, si :

$$\frac{U_1-U_2}{U_2}=\frac{V_{ci}-V_i}{V_i}=K_2\mathfrak{C}'_2+K_1\mathfrak{C}'_1=e-1$$

on peut poser :

$$\frac{U_1-U_2}{U_2}=\frac{V_1}{V_2}-1=e-1 \quad \text{donc :} \quad \frac{V_1}{V_2}=e$$

étant donné que le champ électrique ayant servi à déterminer U_1 et U_2 à partir de V_1 et V_2 est le même (même milieu).

Si nous posons :
$$\begin{cases} \mathfrak{C}'_2/\mathfrak{C}'_1 = n \\ K_2/K_1 = p \\ V_1/V_2 = e \end{cases}$$

nous obtenons pour C'_1 dans la branche ascendante :

$$C'_1 = \frac{\sqrt{4K_1 e\, \mathbf{C}_1 \left(1 - \frac{1}{e}\right)}}{2K_1} = \frac{\sqrt{4K_1 \mathbf{C}'_1 (e-1)}}{2K_1}$$

$$C'_1 = \frac{\sqrt{4K_1 \mathbf{C}'_1 (K_1 \mathbf{C}_1 + K_2 \mathbf{C}'_2)}}{2K_1} = \frac{\sqrt{4(K_1 \mathbf{C}'_1)^2 \left(\frac{K_1 \mathbf{C}_1 + K_2 \mathbf{C}'_2}{K_1 \mathbf{C}'_1}\right)}}{2K_1}$$

$$C'_1 = \frac{2K_1 \mathbf{C}'_1}{2K_1} \sqrt{(pn+1)} = \mathbf{C}'_1 \sqrt{(pn+1)} = C'_1$$

si p = 1, on peut écrire :

$$C'_1 = \mathbf{C}'_1 \sqrt{n+1} = \mathbf{C}'_1 \sqrt{\frac{\mathbf{C}'_2}{\mathbf{C}'_1} + 1} = \mathbf{C}'_1 \sqrt{\frac{\mathbf{C}'_2 + \mathbf{C}'_1}{\mathbf{C}'_1}}$$

comme $\mathbf{C}'_1 + \mathbf{C}'_2 = \mathbf{C}'_t$ on obtient :

$$C'_1 = \mathbf{C}'_1 \sqrt{\frac{C'_t}{\mathbf{C}'_1}} = \sqrt{\mathbf{C}'_1\, C'_t}$$

si C'_1 est exprimé en % de C'_t [$(C'_1/C'_t)\,100$ = pourcentage apparent] on a :

$$C'_1\,\% = \frac{C'_1}{C'_t} \cdot 100 = \sqrt{\frac{\mathbf{C}'_1\, C'_t}{C'_t}} \cdot 100 = 10 \sqrt{\mathbf{C}'_1\,\%}$$

2. — Si $V_1/V_2 = 1$ et p = 1
on obtient :

a) A partir de l'équation initiale :

$$\mathbf{C}'_1 (V_1 - V_2)(1 + KC'_t) = V_1 (1 + KC'_1) C'_1 - V_2 (1 + KC'_t) C'_1$$

$$0 = V_1 (1 + KC'_1) C'_1 - V_2 (1 + KC'_t) C'_1$$

donc :

$$V_1 (1 + KC'_1) C'_1 = V_2 (1 + KC'_t) C'_1$$

$$C'_1 = C'_t$$

b) A partir de la racine positive C'_1 de cette même équation :

$$C'_1 = \frac{-(1-e) + \sqrt{(1-e)^2}}{2K} = \frac{KC'_t + KC'_t}{2K} = C'_t \qquad \text{(anomalies maxima)}$$

3. — Si $V_1/V_2 = \infty$ et p = 1

d'après la relation ((5), [44]) d'une part, et d'après :
$\frac{V_1}{V_2} = \infty = V_1 - V_2$ d'autre part, on obtient :

$$C'_1 = C'_1 \qquad \text{(anomalies nulles).}$$

Il ressort de cette analyse que le très grand intérêt du travail de Hoch est d'avoir pu élaborer, à partir des équations générales de l'électrophorèse, un mode pratique de calcul permettant de corriger l'effet des interactions de frontières sur la proportion des constituants auxquelles elles correspondent. Cependant, ce calcul n'est applicable qu'au cas d'un mélange de deux constituants et ne permet de déterminer que leur différence relative de mobilité.

DEUXIEME PARTIE

RECHERCHES PERSONNELLES

Chapitre Premier

PROTOCOLES EXPERIMENTAUX

A. — Préparation et dosage des solutions d'hémoglobine

Nos recherches ont porté sur des solutions d'oxy-, de carboxy-, de methémo- et de cyanmethémoglobine.

Ces diverses formes de pigment sont obtenues par traitement convenable de l'hémolysat initial préparé à partir de sang humain selon une technique [63] dérivée de celle de Drabkin [37]. La déstromatisation devient presque totale après la dialyse précédant l'électrophorèse par précipitation des stromas sous forme d'une gelée transparente adhérant aux parois du sac de dialyse.

— *Oxyhémoglobine :* L'hémolysat brut renferme 95 % environ de pigment sous cette forme.

— *Carboxyhémoglobine :* Ce dérivé est obtenu à partir du précédent par passage dans celui-ci de gaz d'éclairage lavé ou de CO pur.

— *Methémoglobine :* L'oxydation du pigment est obtenue en additionnant l'hémolysat initial à pH 6,0 environ, d'une solution de ferricyanure de potassium à 20 g. p. 100 ml. en proportion telle que le rapport molaire : $FeCN_6K_3/Hb$ (monomère) = 8/1 [55]. Au bout de quelques heures, le mélange est soumis à une dialyse tournante contre de l'eau distillée pendant 1 jour à $\theta = + 2°$ C.

— *Cyanmethémoglobine :* Cette forme de pigment est obtenue par addition d'une trace de cyanure de potassium à la préparation précédente de methémoglobine à pH voisin de 6,5.

Le dosage de ces dérivés a été effectué selon deux méthodes :

1° Photométrie :

L'oxydation partielle du pigment étant difficilement évitable, il est indispensable de déterminer par photométrie le taux de methémoglobine éventuellement formée au cours de la préparation ou du stockage des solutions.

A partir des courbes d'étalonnage établies par Laurent [63] nous avons dressé des abaques (fig. 11 et 12) permettant la détermination avec une erreur relative de 2 à 3 % du taux de methémoglobine présent dans une solution de COHb ou d'O_2Hb

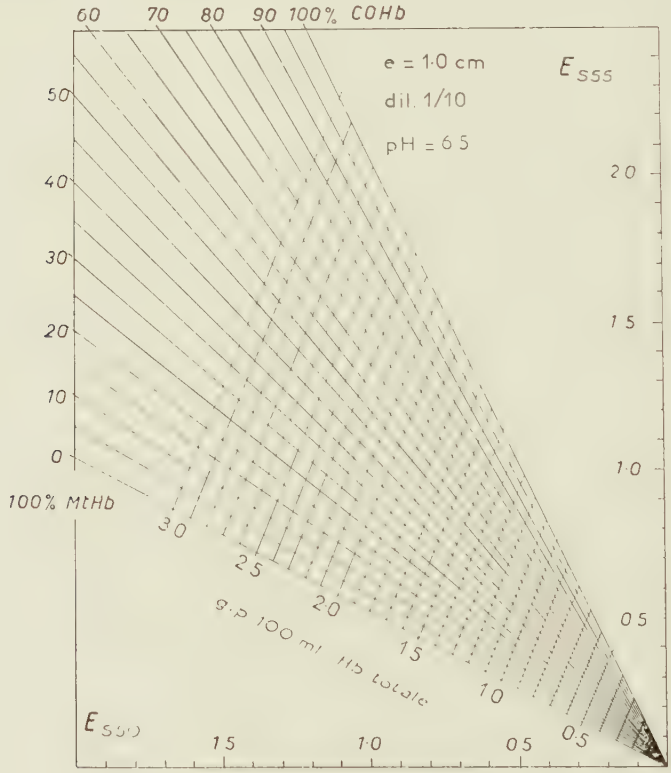


Figure 11. — Abaque utilisée pour la détermination du taux de methémoglobine contenue dans une solution de carboxyhémoglobine et le dosage simultané de l'hémoglobine totale

et le dosage simultané du pigment total. Le principe de cette méthode est basé sur l'absorption différentielle des dérivés hémoglobiniques par les deux filtres S50 (centre de gravité efficace : 4960 Å) et S55 (centre de gravité efficace : 5500 Å) du photomètre de PULFRICH.

Le maintien du pH à 6,6 — 6,7 est assuré par dilution au 1/10 de la solution d'hémoglobine avec une solution de phosphate mono- et dispotassique équimoléculaire (molarité finale = 0,7 M).

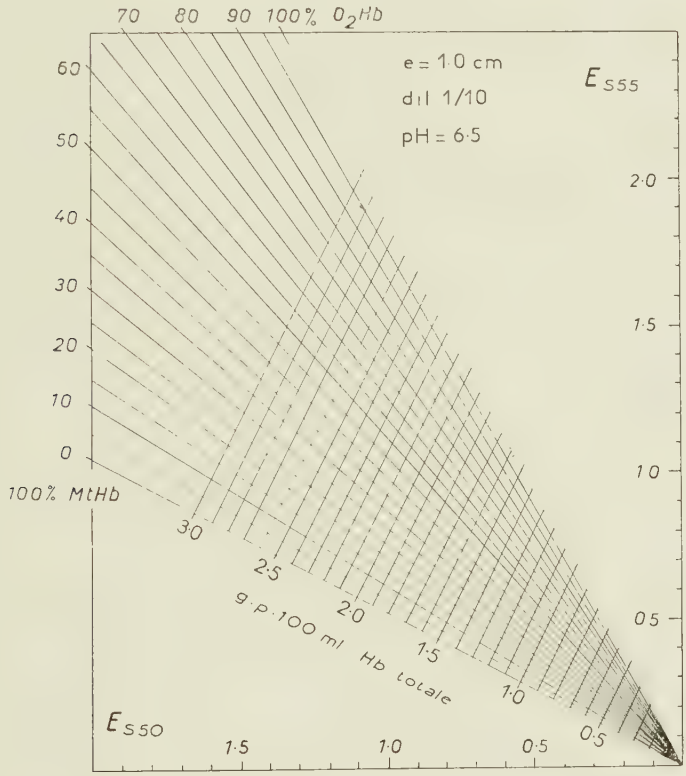


FIGURE 12. — Abaque utilisée pour la détermination du taux de methémoglobine contenue dans une solution d'oxyhémoglobine et le dosage simultané de l'hémoglobine totale

2° RÉFRACTOMÉTRIE :

L'appareil utilisé est le réfractomètre de ZEISS.

Une excellente concordance a été obtenue avec la photométrie

en utilisant la relation suivante que nous avons établie d'après les données de Reiss [84] à $\theta = +20°$ C. :

$$\left[(np)_R - (nt)_R\right] . 0{,}23 = \text{g.p.100 ml} \quad \text{(valable entre 0 et 1 g. p. 100 ml.)}$$

$$\left[(np)_R - (nt)_R\right] . 0{,}22 = \text{g.p.100 ml} \quad \text{(valable entre 1 et 2 g. p. 100 ml.)}$$

$(np)_R$ = indice de réfraction de la solution protéique exprimé en division de Reiss.

$(nt)_R$ = indice de réfraction de la solution tampon (dialysat) exprimé en division de Reiss.

B. — Dialyse préparatoire

On effectue la dialyse soit dans des sacs de collodion mince (1 couche), soit dans des tubes de cellophane (Visking Corp., Chicago) à la température de + 2° C.

Le volume de la solution soumise à la dialyse est de 15 ml., celui de la solution tampon (dialysat) est de 1500 ml. (rapport dialytique = 1/100).

Dans ces conditions, la dialyse s'effectue sans changement appréciable de volume, de sorte que la concentration protéique demeure pratiquement identique à la concentration initiale.

C. — Détermination du pH

Le pH est mesuré au moyen du potentiomètre de Cambridge (sensibilité = 1/50 d'unité pH) à la température + 20° C.

Les solutions tampons ayant servi à l'étalonnage avec une concordance parfaite sont les suivantes :

— Acéto-acétique 0,2 M : $pH_{15° C - 25 C} = 4{,}616 \simeq 4{,}62$

— Phtalate acide de potassium 0,05 M : $pH_{0° C - 40° C} = 3{,}97$

— Borate de sodium, 10 OH_2 0,05 M : $pH_{20° C} = 9{,}18$
$pH_\theta = 9{,}27 - 0{,}008_5 (\theta - 15)$ pour $\theta = 0 - 60°$ C.

D. — Conductimétrie

1° *Le pont de mesure* utilisé est du type Kohlrausch (cf. Shedlovsky [100]) (L-K-B-Produkter, Stockholm). Il permet la mesure de 1 à 11.110 ohms, ce qui correspond à une gamme de conductivité de 1 mho à 9. 10^{-5} mho à ± 0.1 %. La fréquence utilisée est de 800 cps avec un facteur d'amplification aux écouteurs de 5000.

2° *La température* à laquelle s'effectuent les mesures est de + 2° C. Elle est maintenue constante à ± 0,02° C grâce à l'emploi d'un relais électronique (courant de 200 volts d'une valve biplaque GZ 40 débitant sur relais électromagnétique commandé par une triode EL 41 dont le courant grille de 20 μ A traverse le thermomètre VERTEX), d'un agitateur efficace et d'un bac thermostatique de grande capacité et parfaitement calorifugé.

3° *Les cellules de conductivité* sont de deux types :

1° Cellules cylindriques classiques de différentes caractéristiques (cf. chap. relatif à la détermination de la mobilité de l'ion cacodylique).

2° Cellules pour enregistrement des diagrammes de conductivité en électrophorèse.

4° *Enregistrement :* Nous décrirons ce deuxième type de cellule [87]. La microcellule représentée sur la figure 13 est adaptable instantanément sur le nouveau type de haut de cellule à électrophorèse fabriqué par la firme LKB de Stockholm et permet d'obtenir un enregistrement de la conductivité de la veine liquide après électrophorèse avec une sensibilité voisine de celle des dispositifs proposés jusqu'à présent [61], [108], [112].

a) ELECTRODES.

1) Configuration géométrique :

Electrodes plaquées aux parois.

— Longueur : L = 1,4 cm.

— Largeur : l = 0,13 cm.

— Ecartement : l' = 0,3 cm.

— Surface : S = 0,182 cm².

— Position du grand axe médian des électrodes par rapport à la limite optique supérieure de la cuve à électrophorèse = 0,5 cm. (abcisse X_1 de la figure 35).

2) Caractéristiques électriques :

La résistance moyenne mesurée dans nos séries d'expérience est de R = 600 ohms. De ce fait, $S \simeq \frac{100}{R}$ (phénomènes de polarisation minima) [57].

La convergence C qui représente le pourcentage du courant se localisant dans l'espace interélectrode par rapport au courant total est défini expérimentalement par : $C = \frac{K}{l'/S}$

où K = constante de la cellule.

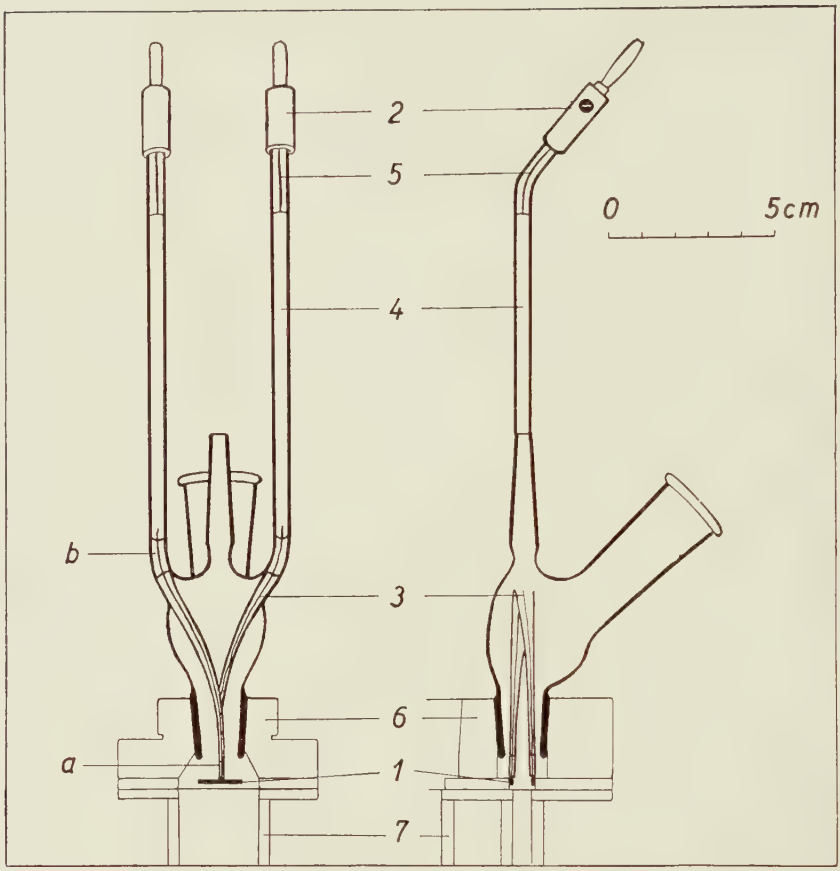


FIGURE 13. — Schéma de la microcellule pour déterminations de conductivité. Electrodes de platine platinée (1) reliées aux fiches mâles (2) par la chaîne des conducteurs suivante : fil de platine (3) noyé dans le verre en *a* et *b*, mercure (4), fer (5). Connection au pont de conductivité par fils blindés non représentés. Haut de cellule (6) et cellule à électrophorèse (7)

Si $K = 0{,}5544$ cm^{-1}, la convergence est égale à : $C = 0{,}33$ c'est-à-dire 33 %.

La largeur relative λ est définie par le rapport suivant :

$$\lambda = \frac{l}{r} = 0{,}433$$

Le pouvoir de résolution absolu ρ_A exprimé en cm. est de :

$$\rho_A = \frac{l}{C} = 0{,}394$$

Le pouvoir de résolution relatif ρ_R est égal à :

$$\rho_R = \frac{\lambda}{C} = 1{,}31$$

On remarque que la faible valeur de la largeur relative λ, rendue possible par une longueur L suffisante, compense la faible convergence du système en donnant un pouvoir de résolution relatif excellent, ce qui dispense de l'emploi d'un anneau de garde. Les valeurs des résistances mesurées (600-700 ohms) sont comprises dans la zone sensible du pont de mesure. La capacité de compensation d'une valeur voisine de 5000 pF est obtenue en ajoutant 3000 pF à la décade des condensateurs destinée à cette compensation.

b) Modalité de l'enregistrement :

Celui-ci dure 1 heure environ. La diffusion des frontières pendant cette période se manifeste par un léger étalement du diagramme des conductivités par rapport au diagramme optique enregistré dès le début des mesures (fig. 35 et 36). Le dispositif de compensation mécanique comporte une immobilisation de la veine liquide de 30 sec. par minute. Un aménagement décrit plus loin [85] (cf. p. 62) permet le repérage des temps d'arrêt au cours desquels les mesures sont effectuées. Les valeurs obtenues sont reportées sur papier millimétré à des intervalles de 2 m/m (grandissement total = 2,5). La vitesse des frontières compensées est de $133{,}3 \cdot 10^{-5}$ cm. sec.$^{-1}$.

E. — Appareil à électrophorèse

L'appareil utilisé est celui de la firme LKB de Stockholm (type 3023). Il est muni du dispositif optique de Tiselius-Philpott-Svensson. Les cellules à électrophorèses sont normalisées (86 m/m de hauteur, 0,75 cm^2 de section).

F. — Régulation automatique de la compensation [85] :

1° *Principe :* Dans la branche ascendante, la frontière de la fraction hémoglobinique la plus rapide sépare la veine liquide en une partie supérieure incolore (solution tampon) et une partie inférieure fortement colorée par le chromoprotéide. Cette dernière absorbe incomparablement plus de lumière que la première. Une cellule photovoltaïque est sensible à telles différences d'intensité lumineuse transmise. Son éclairement « maximum » (frontière entraînée vers le bas de la cuve) déterminera l'arrêt de la compensation alors que son éclairement « minimum » (frontière remontant vers le haut de la cuve sous l'effet de l'électrophorèse) la déclanchera.

2° *Réalisation pratique :* La figure 14 et la légende explicative qui l'accompagne rendent compte de la réalisation pratique de notre dispositif de compensation automatique. Nous nous borne-

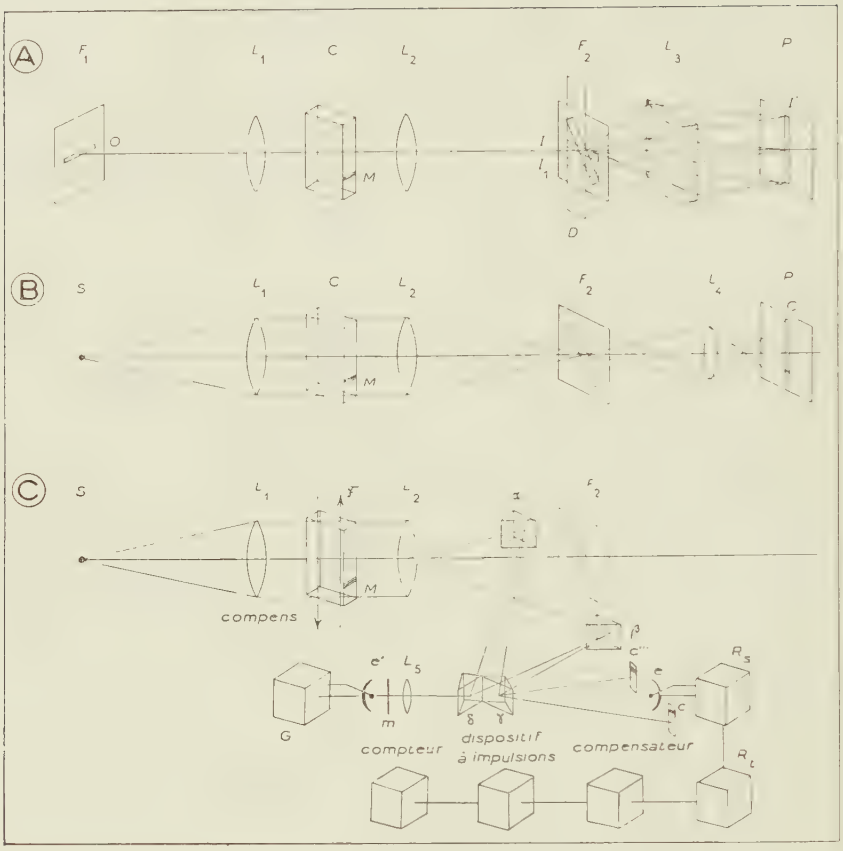


FIGURE 14. — Adaptation de notre dispositif au système optique de PHILPOTT-SVENSSON (l'objet O et la source S ont été représentés séparément).

A. Un objet lumineux O placé à la focale F_1 de la lentille convergente L_1 (schlieren) donne une image réelle renversée I dans le plan focal F_2, commun aux lentilles L_2 et L_3. Cette image I, segment de droite horizontal, détermine avec la fente oblique située également en F_2, un pont lumineux objet. Ce point donne une image linéaire et verticale I' sur la plaque photographique P, par l'intermédiaire de la lentille cylindrique L_3.

Pour obtenir une luminosité suffisante au fonctionnement des cellules photovoltaïques, on a dû donner une grande ouverture au diaphragme-objet O. En conséquence, cette partie du dispositif optique a été modifiée par l'adjoncton d'un couteau D avec tranchant tangent à l'axe optique. Il est appliqué contre la partie supérieure de la fente oblique et est perpendiculaire à l'image I : il en diaphragme de ce fait le point lumineux d'intersection. Ce dernier peut alors donner une image I' très fine.

La frontière M de gradient dn donne de l'objet O une image réfractée I_1.

B. Une source lumineuse S éclaire la cuve à électrophorèse C dont la lentille L_4 donne l'image C' en P. Cette dernière est également affinée par le diaphragme précédent. I' et C' sont confondus quand $dn = O$.

C. L'arête antérieure droite du prisme α joue le rôle du couteau D. En se servant des prismes α, β, γ comme véhicules, on projette l'image de C sur la cellule photovoltaïque de commande e. Cette image est double (C'' et C'''). La cellule e débite sur le relais de sensibilité R_s qui contrôle le relais de travail R_t. Par l'intermédiaire du prisme δ et de la lentille L_5 on impressionne la cellule de contrôle e' dont on ajuste le débit sur le galvanomètre G grâce à la fente verticale m.

rons à formuler ici les quelques remarques suivantes : à un montage électronique avec cellule photoélectrique nous avons préféré un montage moins sensible mais plus robuste utilisant une cellule photovoltaïque Westaphot de 67 $^{m}/_{m}$ de diamètre et un relais de sensibilité Brion-Leroux, type 911289. L'écartement des contacts « mini-maxi » de ce dernier doit être adapté aux débits maxima et minima de la cellule. Aussi importe-t-il, lors du réglage initial du dispositif, de contrôler commodément ces débits. Ceux-ci étant trop faibles pour alimenter en plus du relais et en permanence un galvanomètre à miroir, nous avons dû brancher ce dernier sur une deuxième cellule de même type que la première et en rapport d'éclairement constant avec elle. La surveillance périodique du bon fonctionnement du système est ainsi assurée par un simple coup d'œil au spot lumineux du galvanomètre.

Les électrophorèses sont effectuées à partir de solutions d'hémoglobine à des concentrations très voisines de 1 g. p. 100 ml.

3° *Fonctionnement :* Le principe même du relais de sensibilité à contacts « mini-maxi » impose une certaine latitude de compensation. Aussi la frontière oscille-t-elle entre deux niveaux de la cuve, tantôt entraînée vers le bas par la compensation supérieure à l'effet du champ, tantôt sollicitée vers le haut par le champ seul. La distance Δh séparant ces deux niveaux doit être parcourue dans les deux sens à peu près à la même vitesse pour garder constant l'effet de viscosité le long des parois de la cuve. On choisit à cet effet, une vitesse de compensation approximativement double de la vélocité de la frontière. Il est à remarquer que la valeur Δh croîtra un peu au cours de l'expérience en raison de la dilution progressive de la solution protéique dans le tampon. Elle peut passer ainsi de 25 à 30 $^{m}/_{m}$ (fig. 15).

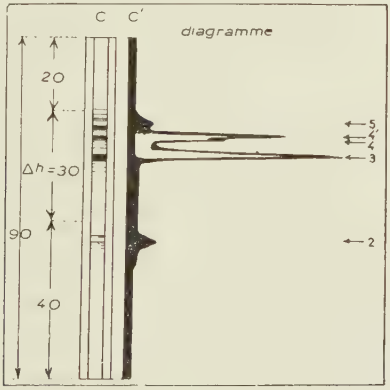


FIGURE 15. — Schéma de la cuve *C* et du trajet de va et vient Δh accompli par la frontière *M* (2, 3, 4, 4' 5 : constituants électrophorétiques de l'hémolysat)

4° *Application à la détermination des mobilités :* Un compteur mis en action par un dispositif d'impulsions électriques indique le temps de compensation t_c en minutes. Connaissant la vitesse de compensation V_c en 10^{-5} cm. sec.$^{-1}$, il est possible de déterminer la longueur L de la veine liquide compensée. Cette longueur correspond au chemin parcouru par la frontière. Rapportée à un intervalle de temps Δt exprimé en secondes, elle permet de calculer la vélocité V du ménisque à Δh près (10^{-5} cm.). L'erreur introduite par Δh peut être diminuée en ajoutant $2\,\Delta h$ à la longueur L de la veine liquide compensée. On peut dès lors éviter d'utiliser les enregistrements pour le calcul approximatif des mobilités.

La conduite des calculs peut se résumer ainsi :

L = longueur de la veine liquide compensée en 10^{-5} cm.

h = variation de la hauteur de la frontière dans la cuve d'électrophorèse en 10^{-5} cm.

V_c = vitesse de compensation en 10^{-5} cm. sec.$^{-1}$.

t_c = durée de la compensation en minutes.

Δt = durée de l'expérience en secondes.

F = gradient de potentiel en volts/cm.

U = mobilité en 10^{-5} cm^2. volt^{-1}. sec.$^{-1}$.

$L = 60\ t_c\ V_c$

$$V = \frac{L + \frac{\Delta h}{2}}{\Delta t} = \frac{(60\,t_c\,V_c) + \frac{\Delta h}{2}}{\Delta t} = t_c\left(60\frac{V_c}{\Delta t}\right) + \frac{\Delta h}{2\Delta t}$$

si $K = 60\,\dfrac{V_c}{\Delta t}$ et $k = \dfrac{\Delta h}{2\,\Delta t}$

$V = t_c\,(K) + (k)$

comme $U = \dfrac{V}{F}$, on a :

$U = t_c\left(\dfrac{K}{F}\right) + \left(\dfrac{k}{F}\right)$

si $K' = \dfrac{K}{F}$ et $k' = \dfrac{k}{F}$

on a : $U = t_c\,(K') + (k')$

Dans le cas d'une expérience menée dans les conditions suivantes :

$h = 27\ ^m/_m = 270.000 \,.\, 10^{-5}$ cm.

$V_c = 80{,}0 \,.\, 10^{-5}$ cm. sec.$^{-1}$

$\Delta t = 68500$ secondes

$F = 7{,}0$ Volts cm.

les valeurs des facteurs K′ et k′ sont égales à :

$K' = 0{,}01$

$k' = 0{,}3$

Si par exemple $t_c = 550$ min., la frontière a une mobilité de :

$$U = (550 \,.\, 0{,}01) + 0{,}3 = 5{,}8 \,.\, 10^{-5} \text{ cm}^2 \,.\, \text{volt}^{-1} \,.\, \text{sec}^{-1}.$$

Nous avons négligé l'erreur introduite par la contraction de la veine compensatrice affluente (refroidissement du contenu de la seringue par pénétration dans la cuve à électrophorèse) et la dilatation de la veine effluente (réchauffement du contenu de la cellule par pénétration dans la seringue). Cette erreur a pour effet de diminuer la valeur de la compensation effective.

G. — **Calculs**

1. — Gradient de potentiel et vélocité :

La mobilité d'une frontière représente une vitesse rapportée à un champ de 1 volt/cm. Il convient donc de déterminer :

1° Le gradient de potentiel : Nous avons choisi tantôt $\varkappa_2$, $\varkappa'$ ou $(\varkappa_2 + \varkappa_1)/2$ pour la branche ascendante, $\varkappa_2$, $\varkappa''$ ou $(\varkappa_2 + \varkappa')/2$ pour la branche descendante. Par ailleurs nous avons adopté l'intensité moyenne telle qu'elle est définie au § concernant l'étude des courants de fuite [86]. La section de la cuve à électrophorèse a été déterminée par la méthode pondérale [5].

Dans nos conditions expérimentales, le courant électrique passant à travers la cuve développe une énergie correspondant à 0,045 watts/cm³, valeur bien inférieure à celle généralement admise en tant que valeur limite dans ces mêmes conditions (0,15 watts/cm³ [7]).

2° La vélocité représente la distance moyenne parcourue dans un intervalle de temps par l'ordonnée centroïde X de la frontière (ou premier moment M_1 du gradient correspondant) telle que $X = \sum_i x_i y_i / \sum_i y_i$ [36, 66]. La détermination de X nécessite, dans le cas des gradients étalés (cf. fig. 49), l'évaluation graphique des coordonnées x et y correspondant à de nombreuses positions i (de 20 à 50 suivant l'étalement de la courbe en cloche) arbitrairement choisies sur la ligne de base. Par contre, dans le cas des gradients aigus, nous avons abaissé du sommet du pic la perpendiculaire à l'axe des x et assimilé cette dernière à l'ordonnée centroïde.

Le grandissement vertical total G_v est égal à 2,5 dans toutes nos expériences.

2. — Proportions relatives des constituants :

L'intégration des gradients de réfraction des frontières permet d'établir les quantités procentuelles des fractions correspondantes. Lorsque les gradients sont confluents, on décompose le diagramme total par construction géométrique classique au moyen d'un jeu de courbes de Gauss [114], ou bien on utilise la méthode des perpendiculaires abaissées à partir des ordonnées minimales entre les pics (méthode de Tiselius rapportée par Audubert et de Mende [12]).

Les surfaces relatives ainsi déterminées ne représentent pas la proportion réelle des constituants.

En effet la théorie de l'électrophorèse (1re partie) permet de prévoir des anomalies dans la proportion apparente des constituants électrophorétiques. Ces anomalies sont dues à des superpositions de gradients et sont d'autant plus accusées que la force ionique du milieu est plus faible.

Quelques auteurs ont proposé des systèmes de correction dans le cas simple de deux constituants indépendants.

Pauling et coll. [79], Wells et Itano [113] utilisent une relation linéaire établie empiriquement à partir de mélanges artificiels des deux constituants analysés.

Hoch-Ligetti et Hoch [44] donnent une équation générale basée sur les données théoriques de Svensson [106] en faisant intervenir un facteur K [42] représentant l'incrément de la vitesse par unité de concentration et commun aux deux constituants.

a) *Détermination du facteur K :* Un facteur identique est utilisé par Johnston et Ogston [53] pour la détermination des concentrations réelles de deux fractions protéiques soumises à l'ultracentrifugation. Nous avons adopté pour sa détermination les deux méthodes indiquées par Hoch (cf. 1re partie).

Méthode I : L'étude expérimentale de la fonction représentée par la figure 9 nous a donné la valeur suivante :

$$K = \operatorname{tg}\alpha \,/\, U_{c=0} = 0{,}625 / 4{,}67 = 0{,}134$$

Nous retrouverons une application de ces données au Chap. II § I A 2 b, p. 100.

Méthode II : On admettra que la vitesse de migration d'une frontière dépend du pH du milieu qui la précède. Si aucun phénomène accidentel (fuites électriques) ne vient perturber les différents pH de la veine liquide, la frontière de la solution diluée migrera au pH de la solution tampon et la frontière de la solution

concentrée au pH de la solution diluée dans la branche ascendante. Il convient donc d'extrapoler la vitesse de l'une des frontières au pH de l'autre.

L'étude de la mobilité électrophorétique de l'ion hémoglobinique en fonction du pH en milieu cacodylique à I = 0.0175 nous permet de considérer la mobilité comme étant une fonction linéaire du pH au voisinage du pH_i (7,5) et notamment dans la zone du pH s'étendant entre 6,0 et 7,5 (fig. 38).

Cette fonction expérimentale a été établie pour une concentration protéique de 1. g. p. 100 ml., mais il y a lieu de penser que cette relation demeure linéaire pour des concentrations protéiques voisines, seul le coefficient angulaire devant changer.

Dès lors, si l'on admet :

que U = f (pH) est linéaire dans la zone de pH considérée et à la force ionique considérée,

et que le champ électrique se calcule à partir de la conductivité moyenne de la veine liquide ascendante,

on peut dire que l'augmentation procentuelle de la vélocité est inversement proportionnelle à la différence (7,5 — pH) :

$$\frac{\Delta V}{V} . 100 = \frac{\Delta pH}{(7,5 - pH)} . 100$$

En posant $\Delta pH = 0,1$, on a :

$$\frac{\Delta V}{V} . 100 = \frac{10}{(7,5 - pH)}$$

Dans les limites expérimentales définies, un segment d'hyperbole équilatère représente cette fonction qui, par ailleurs, est indépendante du coefficient angulaire de la fonction : U = f (pH). (fig. 16).

Expérience 481-482 (*tab. VIII*) :

Nous extrapolons la vélocité de la frontière de la solution diluée :

$$10/7,50 - 6,52 = 10,2\ \%\ \text{pour}\ \Delta pH = 0,1$$

$$10,2 \ .\ 1,8 = 18.36\ \%\ \text{pour}\ \Delta pH = 0,18$$

les 18,36 % de 39,45 représentent : 7,22.

On obtient pour K la valeur de :

$$K = \frac{50,63 - 39,35 + 7,22}{(1,20 - 0,53)\ 39,35 + 7,22} = 0,130$$

Expérience 478-479 (*tab. IX*) :

De la même manière on obtient :

$$K = \frac{42,66 - 32,45 + 6,49}{(1,35 - 0,50)\ 32,45 + 6,49} = 0,112$$

La valeur moyenne adoptée est : $K = 0,128$

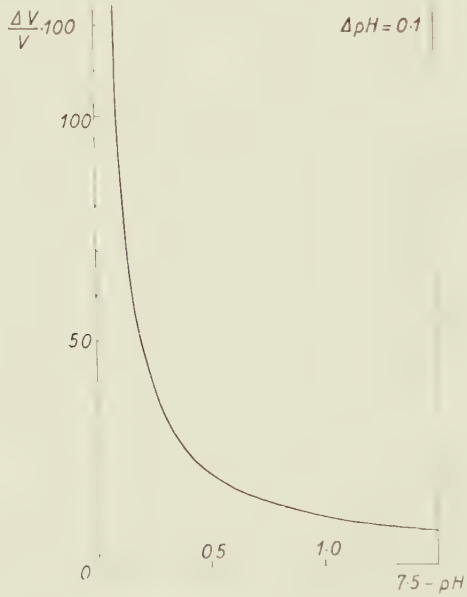


FIGURE 16. — Augmentation procentuelle de la vélocité V en fonction du pH

TABLEAU VIII

Expérience 481-482 :

	Front. « dil. »	Front. « conc. »
Conc. prot. en g. p. 100 ml	0,53	1,20
pH à 20° C	6,52	6,34
V. 10^5 cm. sec.	39,35	50,63

TABLEAU IX

Expérience 478-479 :

	Front. « dil. »	Front. « conc. »
Conc. prot. en g. p. 100 ml	0,50	1,35
pH à 20° C	6,50	6,30
V. 10^5 cm. / sec.	32,45	42,66

Rappelons que Beaven, Hoch et coll. [15] trouvaient pour la carboxyhémoglobine humaine en milieu phosphate I = 0,03, pH = 8,2, les valeurs respectives de K = 0,123 pour C_1 = 1 g. p. 100 ml. et de K = 0.135 pour C_1 = 1,2 g. p. 100 ml. Comme ces auteurs l'ont constaté, un tel écart n'introduit aucune différence sensible dans la détermination des proportions réelles des constituants.

La valeur de K, introduite dans l'équation (7) de Hoch-Ligetti et Hoch [44] :

$$\mathbf{C}'_1 = \frac{C'_1}{1 + \frac{V'_1}{S} K \left(C'_t - C'_1\right)}$$

permet le calcul de la proportion réelle du constituant le plus rapide.

b) *Détermination graphique de la proportion réelle du constituant rapide :* Deux modalités nous sont offertes pour effectuer la résolution de cette fonction par représentation graphique [88] :

1° L'emploi d'un nomogramme.

2° L'utilisation d'une équation approchée.

I. — Nomogramme : Le nomogramme proposé est cartésien à coordonnées semi-logarithmiques de rapport 1/20°. Une droite pivotant autour de *O* représente l'unique élément mobile.

L'échelle linéaire de S est telle que son intersection avec l'axe V'_1 détermine une abcisse S = 10 K. La figure 17 représente un tel nomogramme pour K = 0,128.

II. — Equation approchée : L'équation (5) de Hoch-Ligetti et Hoch [44] peut s'écrire sous la forme :

$$\mathbf{C}'_1 = C'_1 \left[1 - \frac{V'_1 K C'_t}{(V'_1 - V'_2)(1 + K C'_t)} \right] + \frac{C'^2_1 V'_1 K}{(V'_1 - V'_2)(1 + K C'_t)}$$

En exprimant les concentrations en % de C'_t et en posant : $e = 1 + KC'_t$, on peut écrire :

$$\mathbf{C}'_1 = C'_1 \left[1 - \frac{V'_1 (e-1)}{(V'_1 - V'_2) e} + \frac{C'_1}{100} \cdot \frac{V'_1 (e-1)}{(V'_1 - V'_2) e} \right] \qquad (1)$$

Dans le cas où $V'_1/V'_2 \simeq e$, on obtient :

$$\frac{V'_1 (e-1)}{(V'_1 - V'_2) e} \simeq \frac{V'_2 (e-1)}{V'_1 - V'_2} = b$$

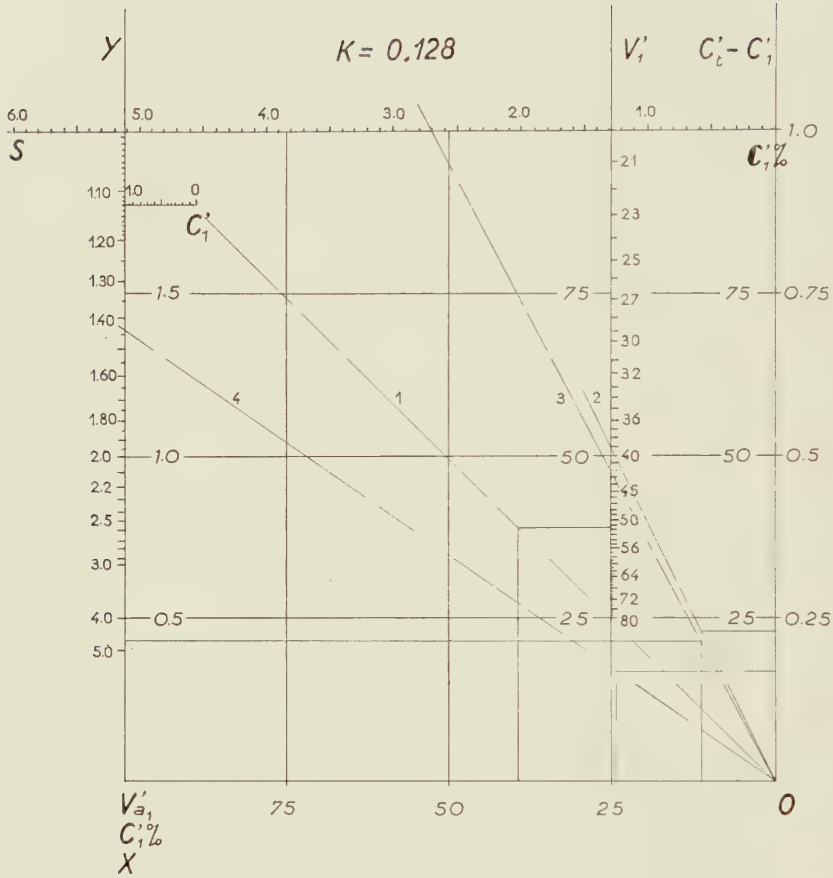


FIGURE 17. — Nomogramme établi pour K = 0,128

Mode d'emploi :

1. On détermine V'_1 (partie gauche de l'échelle double) à partir de V'_{a1} en fonction de C'_1.

2. La valeur V'_1 ainsi obtenue est reportée sur la partie droite de cette même échelle. On détermine l'abcisse X correspondant à (C'_t — C'_1) en fonction de V'_1.

3. A cette abcisse X correspond en fonction de S une ordonnée Y (partie droite de l'échelle double).

4. En fonction de la valeur Y + 1 reportée sur la partie gauche de cette même échelle, on détermine C'_1 % connaissant C'_1 %.

Exemple :

L'exemple représenté sur le nomogramme comprend les paramètres suivants : $C'_t = 0{,}30$ g. p. 100 ml. ; $C'_1 = 0{,}07$ g. p. 100 ml., soit 24,3 % ; $V_{a1} = 39{,}45.10^{-5}$ cm. sec.$^{-1}$; $S = 2{,}7.10^{-5}$ cm. sec.$^{-1}$. C'_1 calculé d'après l'équation (7) de HOCH-LIGETTI et HOCH [44] a la même valeur que celle obtenue ci-dessus soit 17 %.

Finalement l'équation (1) peut s'écrire sous la forme :

$$\mathbf{C}'_1 \simeq C'_1\left[1-b+\frac{C'_1}{100}\,b\right]=C'_1\left[1+b\left(-1+\frac{C'_1}{100}\right)\right] \qquad (2)$$

Nous proposons de remplacer l'équation (7) [44] obtenue à partir de l'équation (5) [44] par :

$$\mathbf{C}'_1 = 100\left(\frac{C'_1}{100}\right)^{b+1} = 100\left(\frac{C'_1}{100}\right)^{a} \qquad (3)$$

tel que :

$$a=\frac{KC'_1}{\frac{V'_1-V'_2}{V'_2}}+1 \qquad (3')$$

En effet,

$$\mathbf{C}'_1 = C'_1\left(\frac{C'_1}{100}\right)^{b} = C'_1\,\mathbf{e}^{\,b\ln\left(\frac{C'_1}{100}\right)}$$

qui correspond à la série :

$$\mathbf{C}'_1 = C'_1\left[1+b.\ln\left(\frac{C'_1}{100}\right)+\frac{\left[b.\ln\frac{C'_1}{100}\right]^2}{2}+\ldots\ldots\right. \qquad (4)$$

La somme de tous les termes de cette série étant voisine de la valeur du premier terme, on peut écrire :

$$\mathbf{C}'_1 = C'_1\left[1+b.\ln\left(\frac{C'_1}{100}\right)\right]$$

Or,

$$\ln\left(\frac{C'_1}{100}\right)=\ln\left(1+\frac{C'_1-100}{100}\right)=\ln\left(1-\frac{100-C'_1}{100}\right)\simeq -1+\frac{C'_1}{100}$$

en admettant que $C'_1 \simeq 100$.

L'équation (4) peut donc s'écrire sous la forme :

$$\mathbf{C}'_1 = C'_1\left[1+b\left(-1+\frac{C'_1}{100}\right)\right]$$

identique à l'équation (2).

Cette identité nécessite en bref les deux conditions suivantes :

1° $V'_1/V'_2 \simeq e$. Il en résulte que $a \simeq 2$, ce qui correspond au cas expérimental le plus fréquent.

2° $C'_1 \simeq 100\,\%$. En fait le tableau X calculé à partir des résultats expérimentaux de Beaven et coll. (tab. II, p. 376, [15]) nous montre que l'approximation demeure satisfaisante quelque soit la valeur de C'_1 %.

TABLEAU X

C'_1 %	a	C'_1 %	C'_1 : d'après l'équation (7) de Hoch-Ligetti et Hoch [44]
26	2,02	6,6	6,5
34	2,34	8,0	6,9
43	2,43	12,9	11,0
55	2,55	21,7	21,0
68	3,26	28,6	25,0
39	2,07	14,3	15,0
50	2,68	15,6	13,0
36	2,07	12,1	16,0
55	2,55	21,7	21,0
79	2,59	54,5	54,0
94	2,25	87,1	88,0

Détermination de l'exposant a : En considérant :

$$1°/\ \frac{V'_1 - V'_2}{V'_2} \simeq \frac{V'_1 - V'_2}{V'_1}\ ,\quad a = \frac{KC'_t}{\frac{V'_1 - V'_2}{V'_1}} + 1$$

$$2°/\ V'_{o_1} = V'_1\left(1 + KC'_t\right) \simeq V'_1\ ,$$

on obtient à partir de l'équation (6) [44] :

$$a = \frac{V'_{o_1}\left[KC'_t + (KC'_t)^2\right]}{S + V'_{o_1}\ K\left(C'_t - C'_1\right)} + 1 \qquad (5)$$

TABLEAU XI (1)

C'_1 %	C'_t (g. m. 100 ml)	C'_1 (g. m. 100 ml)	K	$V'_1 \simeq V'_{a1}$	S	a équation (5)	a équation (3')
30	1,2	0,36	0,06	29	0,35	2,23	2,20
50	1,5	0,75	»	37	0,3	2,84	2,80
50	1,4	0,70	»	25	0,25	2,75	2,68
30	0,7	0,21	»	30	0,6	1,89	1,7
60	1,2	0,72	»	78	0,43	3,24	3,40
60	1,3	0,78	»	26	0,18	3,37	3,23
25	0,7	0,175	»	10	0,3	1,71	1,7
70	1,3	0,91	»	25	0,2	3,70	3,6
60	1,2	0,72	»	55	0,43	3,10	3,06
50	1,2	0,60	»	24	0,25	2,66	2,60
75	1,4	1,05	»	23	0,2	4,07	4,36
50	0,8	0,4	»	16	0,45	1,96	1,96
75	1,2	0,9	»	19	0,13	4,1	3,88
75	1,0	0,75	»	16	0,3	3,08	3,0

(1) Les valeurs expérimentales consignées dans ce tableau sont empruntées au tableau 1 p. 559 du travail de Hoch-Ligetti et Hoch [44].

L'équation (5) très voisine de l'équation (3') (cf. tab XI) permet de déterminer l'exposant a de la fonction exponentielle (3) sans faire intervenir : $\frac{V'_1 - V'_2}{V'_1}$

L'abaque de la figure 18 représente une famille d'équations (3) pour des valeurs de a définies. Elle traduit synoptiquement la valeur des corrections à apporter dans le calcul de la proportion relative du constituant 1.

Remarque : L'étude de l'équation (3) permet de retrouver les trois cas particuliers envisagés par Hoch [42] et relatés dans la première partie (p. 49).

1°/ $V'_1/V'_2 = \infty$, $a = 1$, $C'_1 = C'_1$

2°/ $V'_1/V'_2 = e$, $a = 2$, $C'_1 = C'^2_1/100$

3°/ $V'_1/V'_2 = 1$, $a = \infty$, $C'_1 = 100$

$(C'_1 = C'_f = 100)$

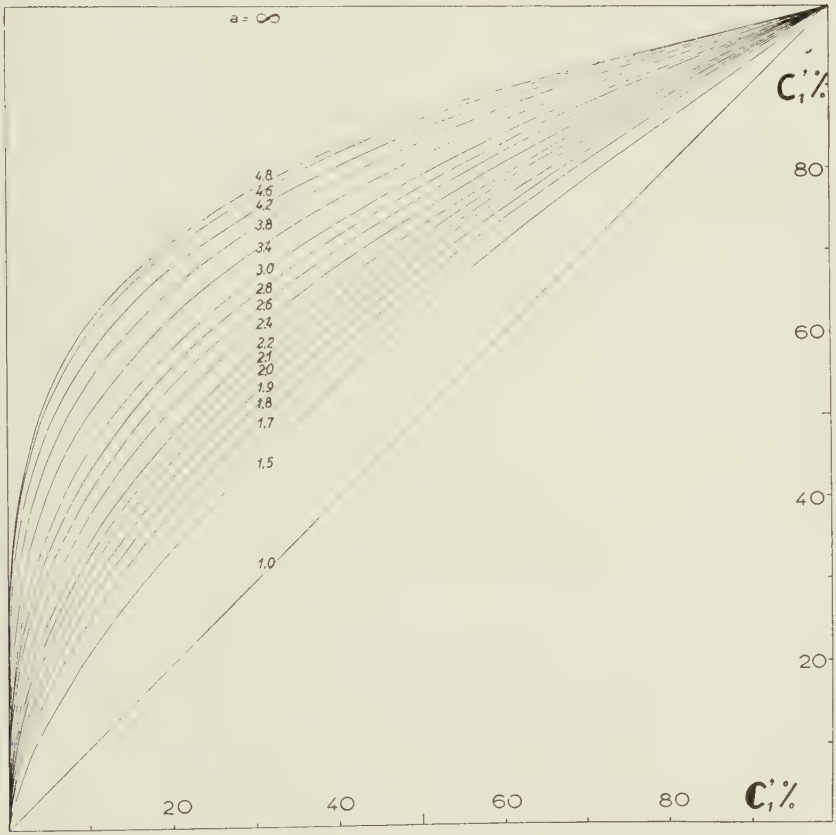


Figure 18. — Expression graphique de la fonction : $C'_1 = 100. \left(\frac{C'_1}{100}\right)^a$.

H. Détermination de la mobilité de l'ion cacodylique :

Cette détermination a été faite par conductimétrie.

On sait que la conductivité équivalente limite Λ_∞ d'un ion est exprimée par le produit **F** . u (**F** = faraday ; u = mobilité de l'ion). La loi d'additivité de KOLRAUSCH permet de connaître la conductivité équivalente limite d'un sel formé par deux ions de mobilité connue : $\Lambda_\infty = \mathbf{F}\,(u + v)$, u étant la mobilité de l'anion, v étant la mobilité du cation. Inversement, il est possible de calculer l'une des mobilités connaissant la valeur des deux autres termes.

1° DÉTERMINATION DE LA CONDUCTIVITÉ ÉQUIVALENTE LIMITE DE L'ION CACODYLIQUE :

La relation qui unit la conductivité équivalente Λ à la concentration γ exprimée en équivalents-grammes par litre est étudié sous la forme linéraire :

$$\Lambda = f\,(\sqrt{\gamma}) \qquad (1)$$

Seuls les électrolytes forts (dissociation complète) se prêtent à une telle étude. En effet l'extrapolation de la fonction (1) à $\gamma = 0$ devient d'autant plus approximative que cette dernière s'écarte d'une droite. L'étude graphique de la conductivité équivalente de l'ion cacodylique se prête convenablement à cette étude avec le cacodylate de sodium.

La cellule de conductivité se compose essentiellement de deux électrodes de platine platiné. Cinq cellules de constante K différente ont été utilisées pour couvrir la gamme de conductivité à mesurer. Le tableau XII donne les détails du calcul de ces constantes.

L'eau est bidistillée sur permanganate de potassium dans un appareil en verre pyrex. Sa conductivité est inférieure à $2.\,10^{-6}$ mho/cm.

On trouvera sur le tableau XIII les résultats relatifs à la détermination de la conductivité équivalente limite de l'ion cacodylique. La figure 19 représente la courbe $\Lambda = \sqrt{\gamma}$. L'extrapolation donne la valeur $\Lambda_\infty = 40{,}0$

A + 2° C la conductivité équivalente limite de l'ion Na^+ est de : $\Lambda_{\infty\,Na^+\,+\,2°\,C} = 43{,}16\,[1 + 0{,}0244\,(2 - 18)] = 26{,}3$ en prenant la valeur de 43,16 à + 18° C et $\alpha = 0{,}0244$ comme coefficient de température [13].

TABLEAU XII

Solution ClK (P. M. = 74,56)			Cellule	K cell.	K moy.
Normalité N	$\varkappa$ à + 2° C (mho/cm)	Ω	N°	(cm^{-1})	(cm^{-1})
0. 01	8,25 . 10^{-4}	2890	I	2,38420	2,38420 (1)
0. 01	8,25 . 10^{-4}	489	II	0,40343	0,39953
0. 001	8,37 . 10^{-5}	4725 ± 5	II	0,39564	
0. 001	8,37 . 10^{-5}	2855	III	0,23896	0,23896
0. 001	8,37 . 10^{-5}	1039 ± 4	IV	0,08696	0,08725
0. 001	8,37 . 10^{-5}	1046	IV	0,08755	
0. 001	8,37 . 10^{-5}	283	V	0,02369	0,02611
0. 001	8,37 . 10^{-5}	341	V	0,02854	

(1) La cellule I est utilisée pour les déterminations de conductivité des solutions employées en électrophorèse.

TABLEAU XIII

Conductivité équivalente du cacodylate de sodium à + 2° C (P. M. = 159,972).

γ	$\sqrt{\gamma}$	Ω	K cell.	$\varkappa$ (10^{-3})	Λ
10^{-1}	0,316	1004	2,38420	2,37470 →	23,7
5. 10^{-2}	0,224	1903	2,38420	1,25312 →	25,1
2. 10^{-2}	0,141	4471	2,38420	0,53326 →	26,7
10^{-2}	0,100	8709	2,38420	0,27376 →	27,4
5. 10^{-3}	0,0707	2923	0,39953	0,136685 →	27,4
10^{-3}	0,0316	8320	0,23896	0,02872	28,7
				0,02873 →	
		3035	0,08725	0,02875	
5. 10^{-4}	0,0224	5815	0,08725	0,01500	32,0
		1534	0,02611	0,01601 →	
				0,01702	
10^{-4}	0,0100	7180	0,02611	0,00363 →	36,4
0		par extrapolation graphique Λ_∞ = 40. 0			

La conductivité équivalente limite de l'ion cacodylique est de :

$$\Lambda_{\infty_{coco^-}} = 40,0 - 26,3 = 13,7$$

La mobilité de cet ion à + 2° C est donc de :

$$U = \Lambda_\infty / F = 13,7/96490 = 14,2 \ . 10^{-5} cm^2.volt^{-1}.sec^{-1}$$

Nichol [77] publie les mobilités suivantes à la température de 0° C. :

$\gamma = 0.1$ U = — 10,1 . 10^{-5}
$\gamma = 0.05$ U = — 11,4 . 10^{-5}
$\gamma = 0.01$ U = — 13,2 . 10^{-5}

Si nous extrapolons graphiquement ces valeurs à la concentration $\gamma = 0$, nous obtenons : $U = -14{,}6 \cdot 10^{-5}$, valeur sensiblement voisine de celle que nous avons obtenue (fig. 20).

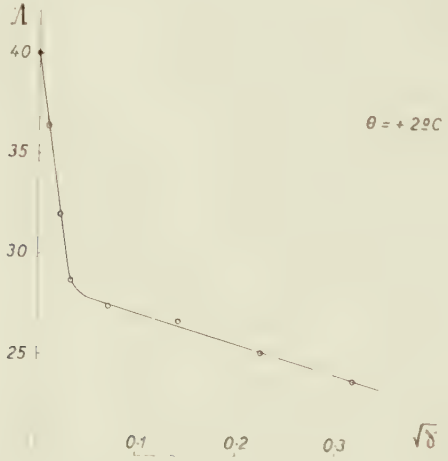


FIGURE 19. — Conductivité équivalente du cacodylate de sodium

Cependant, les bases sur lesquelles nous avons calculé la valeur de U ne sont pas à l'abri de toutes critiques. Nous avons considéré la courbe représentative de la fonction : $\Lambda = f(\sqrt{\gamma})$ comme étant celle d'un électrolyte faible, or, comme le montre la figure 19, elle présente deux branches pratiquement linéaires pouvant traduire, l'une, le caractère d'électrolyte fort du cacodylate de sodium et l'autre l'hydrolyse de ce sel aux grandes dilutions. Si tel était le cas, l'introduction dans la relation d'ONSAGER de la valeur $\Lambda_\infty = 29{,}2$ déterminée par extrapolation de la première branche, devrait conduire à une représentation graphique théorique de $\Lambda = f(\sqrt{\gamma})$ superposée ou très proche de la courbe expérimentale.

En fait, dans les conditions expérimentales que nous avons adoptées, les deux constantes *a* et *b* de la relation d'ONSAGER :

$$\Lambda = \Lambda_\infty - \left[a + b\,\Lambda_\infty\right]\sqrt{\gamma}$$

ont respectivement pour valeur : a = 22,42 et b = 0,217, et la pente de la droite représentative est de — 28,76 valeur notablement supérieure en valeur absolue à la pente de la droite expérimentale, soit — 17,0. Il semble dès lors difficile d'admettre que la variation de la conductivité équivalente du cacodylate de sodium en fonction de la concentration soit régie par la relation d'ONSAGER, et par là, que ce sel puisse être assimilé à un électrolyte fort sur ces seules bases.

TABLEAU XIV

Conductivité équivalente de l'acide cacodylique à + 2° C (P. M. = 137,983)

γ	$\sqrt{\gamma}$	Ω	K (cm.$^{-1}$)	$\varkappa$ (10^{-3} mho/cm)	Λ
10^{-1}	0,316	2005	0,08725	0,0435198	0,435
$5 . 10^{-2}$	0,224	2735	0,08725	0,0319039	0,638
$2 . 10^{-2}$	0,141	3875	0,08725	0,0225180	1,125
10^{-2}	0,100	5250	0,08725	0,0166204	1,662
$5 . 10^{-3}$	0,0707	7285	0,08725	0,0119776	2,394
10^{-3}	0,0316	3880	0,02611	0,0067305	6,730
$5 . 10^{-4}$	0,0224	6000	0,02611	0,0043524	8,704
10^{-4}	0,0100	8290	0,02611	0,00315012	31,50
0	Extrapolation irréalisable				

2° Dissociation de l'acide cacodylique :

Le degré de dissociation d'un acide s'exprime par le rapport :

$$\alpha = \frac{\Lambda}{\Lambda_\infty}$$

où Λ représente la conductivité équivalente à la concentration γ. Le tableau XIV et la courbe de la figure 21 rendent compte de la variation de la conductivité Λ de l'acide cacodylique en fonction de la racine carrée de la concentration γ à la température de + 2° C.

L'extrapolation à $\gamma = 0$ est irréalisable (électrolyte faiblement dissocié). La valeur de Λ_∞ est obtenue par la loi d'additivité :

$$\Lambda_{\infty\,acide} = \Lambda_{\infty\,cacod^-} + \Lambda_{\infty\,H^+}.$$

A + 2° C la conductivité équivalente limite de l'ion H^+ est de :

$$\Lambda_{\infty\,H^+_{+2°C}} = 315,2 \left[1 + 0,01573\,(2-18)\right] = 236$$

en prenant la valeur de 315,2 à 18° C et $\alpha = 0,01573$ comme coefficient de température [13].

Ainsi : $$\Lambda_\infty = 236 + 13,7 = 249,7$$

Le degré de dissociation α de l'acide cacodylique se détermine ainsi :

La conductivité Λ acide à $\gamma = 0,00125$ (concentration moléculaire de l'acide dans le tampon cacodylique I = 0,0175, pH = 6,5), obtenue par interpolation graphique (fig. 21), est égale à 5,7.

D'où : $$\alpha = \frac{\Lambda}{\Lambda_\infty} = \frac{5,7}{249,7} = 2,283 . 10^{-2} \simeq 2,28 . 10^{-2}$$

La constante de dissociation K est égale à :

$$K_{+2°C} = \frac{\alpha^2 \gamma}{1-\alpha} = \frac{5{,}207.10^{-4}.1{,}25.10^{-3}}{1-0{,}02228} = 6{,}6.10^{-7}$$

d'où pK = 6,18.

Rappelons que MICHAELIS et DAVIDSOHN [74] ont donné la valeur de : $K_{25°C} = 6{,}4.10^{-7}$; pK = 6,19.

En adoptant cette dernière constante, le degré de dissociation α, à + 2° C, est égal à : $\alpha = 2{,}236.10^{-2} \simeq 2.24.10^{-2}$, valeur en accord avec celle déterminée par conductimétrie.

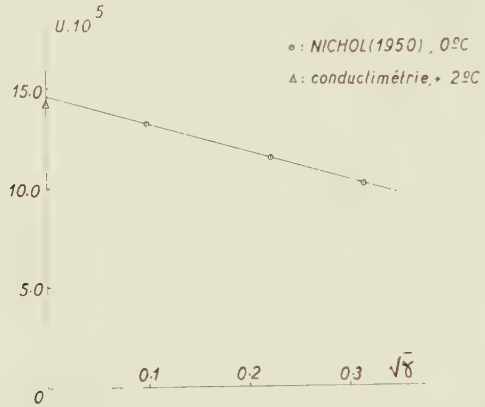


FIGURE 20. — Mobilités de l'ion cacodylique (valeurs négatives)

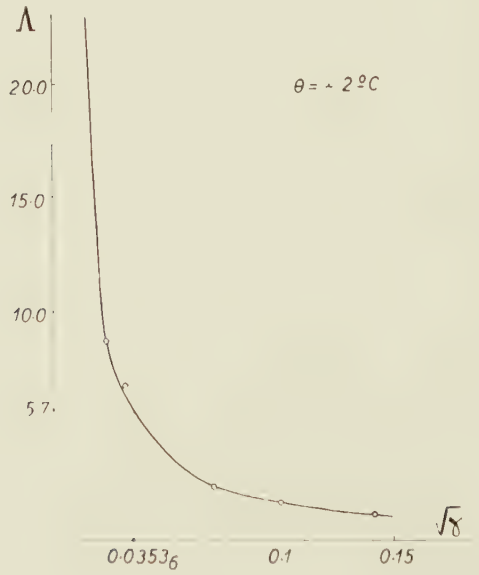


FIGURE 21. — Conductivité équivalente de l'acide cacodylique

Il semble dès lors que l'on soit en droit d'admettre que la valeur de Λ_{∞} extrapolée à partir de la courbe reproduite sur la figure 19 soit correcte. Par ailleurs, la mobilité de l'ion cacodylique calculé en tenant compte de cette valeur étant pratiquement identique à celle établie par NICHOL [77], nous l'avons adoptée dans la suite de nos calculs.

3° COEFFICIENT D'ACTIVITÉ DU CACODYLATE DE SODIUM :

Nous avons adopté pour le coefficient d'activité de l'ion cacodylique la valeur : $f_{caco} = 0{,}57$. En effet, l'introduction de cette valeur dans l'équation d'HENDERSON :

$$pH = pK + \log [caco^-] . f_{caco}/[cacoH]$$

permet de retrouver, par le calcul, le pH expérimental du mélange tampon.

I. — Conditions expérimentales de l'électrophorèse en tampon de faible force ionique

1. — COURANTS ÉLECTRIQUES DE FUITE ET GRADIENTS DE pH [86].

L'abaissement de la force ionique des tampons à base de phosphates alcalins ou d'ions cacodyliques s'est révélé favorable à l'individualisation électrophorétique de constituants protéiques de mobilité très voisine. Elle a notamment permis la meilleure séparation des hémoglobines humaines de type fœtal et de type adulte [15, 89] et la mise en évidence de l'hétérogénéité de cette dernière [32, 33]. La dilution des solutions salines présente cependant l'inconvénient d'abaisser leur pouvoir tampon et l'on a généralement admis que la constance du pH ne pouvait plus être assurée au cours des électrophorèses pratiquées dans de telles conditions, impropres de ce fait à des déterminations correctes de mobilité.

A notre connaissance, aucune recherche expérimentale n'a été systématiquement entreprise sur les éventuelles variations de pH pouvant survenir en cours d'électrophorèse.

Le rôle essentiel du tampon étant de conférer une certaine charge aux molécules protéiques, des modifications de pH en cours d'expérience ne saurait être dues au seul abaissement du pouvoir tampon.

Le présent paragraphe a pour objet de rapporter le résultat de recherches que nous avons entreprises sur les variations de pH susceptibles de se manifester dans les divers secteurs du dipositif de TISELIUS et de démonter que celles-ci sont principalement dues à des phénomènes perturbateurs d'électrolyse liés à l'établissement de courants de fuite.

a) *Etude expérimentale*

Nous définirons tout d'abord l'origine et les circuits empruntés par les courants électriques de fuite, de même que les modalités de leur mesure.

Courants électriques de fuite : On sait que des « fuites électriques », d'intensités diverses, sont détectables dans la plupart des expériences d'électrophorèse en veine liquide ; elles sont dues à des défauts d'étanchéité des rodages reliant les divers éléments du dispositif cellule-vases à électrode de TISELIUS. C'est ainsi qu'entre deux rodages défectueux A et B peut s'établir un courant dérivé, se fermant à travers l'eau du thermostat et le chassis métallique supportant l'ensemble du dispositif (fig. 22 *a*).

Le calcul du champ électrique établi dans la cellule nécessite la connaissance de l'intensité de la fuite dont la mesure est assurée, dans l'appareil à électrophorèse de la firme L. K. B. (Stockholm), par le montage permanent d'un micro-ampèremètre *g* selon le schéma *b* de la figure 22.

L'examen de ce schéma montre que la polarité négative du générateur conférée à la masse a pour effet de canaliser les courants de fuite sur cette dernière. Il en résulte une inversion des polarités de la résistance de fuite r'' dont rend compte la comparaison des schémas *a* et *b* de la figure 22 [1].

Dans le cas d'électrophorèse en tampon cacodylique de force ionique : I = 0,018 et de conductivité : $\varkappa_{+2^\circ C} = 0{,}98.\ 10^{-3}$ mho/cm, effectuées sous 280 volts et 0,005 ampères (i_0), au cours desquelles s'est établi un courant de fuite : $i_g = 0{,}0002$ ampères, on peut indiquer, à titre d'exemple, que la résistance de l'ensemble cellule-vases à électrode : R1 + R2 + R3, est égale à 56 K Ω et que la somme des résistances de fuite (montées en parallèles) : Σr est égale à 700 K Ω.

Il convient, en outre, de noter que les valeurs des résistances de fuite r peuvent être très vraisemblablement considérées comme voisines et que la résistance du système cellule-vases à électrode est la plus élevée au niveau de la cellule (R2), soit 28 K Ω dans le cas de l'exemple ci-dessus. Il en résulte que, d'une manière générale, le circuit R1 + r' est parcouru par une intensité plus grande que celui traversant R1 + R2 + r''.

(1) Le seul inconvénient d'un tel montage est de permettre la fermeture d'un circuit dérivé à partir d'*une seule fuite*. Il n'y a cependant aucun intérêt à passer du schéma 22 *b* au schéma 22 *a* en cours d'expérience. En effet, après avoir constaté l'existence d'un courant de fuite grâce au montage 22 *b*, on n'est nullement assuré de l'éliminer totalement en déconnectant la mise à la masse schéma 22 *a*). Un courant dérivé, d'intensité plus faible (i'_g), peut alors s'établir entre deux fuites sans qu'il soit possible de le mesurer. Les conditions réelles de l'électrophorèse seraient dès lors indéterminées.

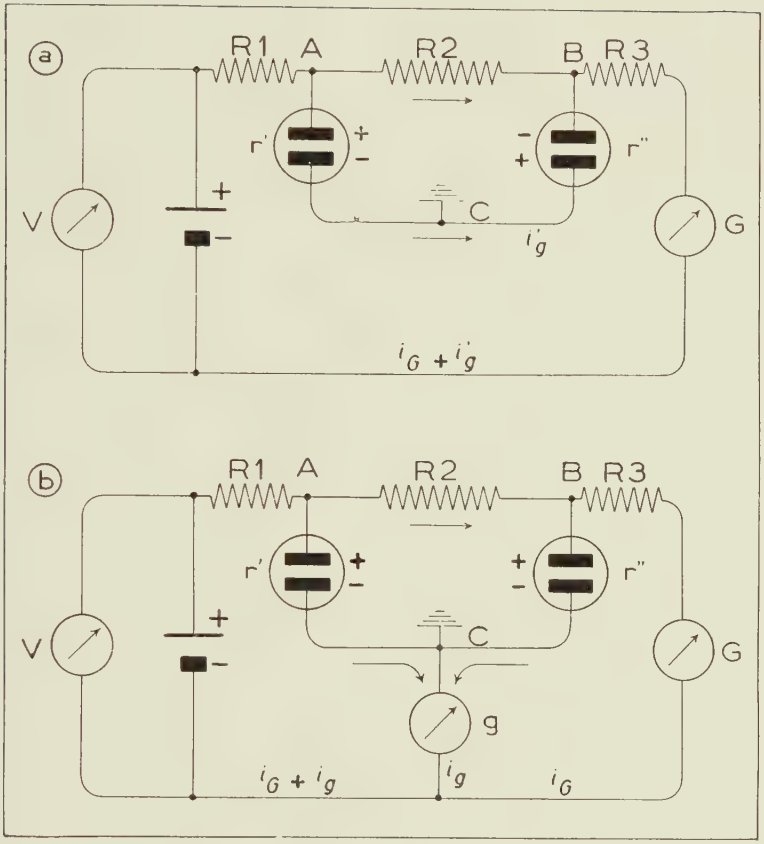


FIGURE 22. — Circuits des courants électriques de fuite avec (*b*) et sans (*a*) galvanomètre de contrôle

R1 + R2 + R3 = résistance de l'ensemble du dispositif cellule-vases à électrode. (Résistance ohmique pure, système impolarisable).

R2 : résistance totale de la cellule dans cet exemple.

r′, r″ : résistances de fuite. (Résistances électrolytiques, système polarisable).

A, B : niveaux des fuites. (Rodages défectueux du haut de cellule dans cet exemple).

C : chassis métallique.

G et i_G : galvanomètre principal (milliampèremètre) et intensité du courant principal.

g, i_g et i'_g : galvanomètre des fuites (microampèremètre) et intensités totales des courants de fuite.

$i_G + i_g$ = intensité constante (débit stabilisé).

V : voltmètre.

⟶ : sens conventionnel du courant.

Les données fournies par le galvanomètre *g* correspondent évidemment à la somme des intensités passant par les résistances de fuite *r*. La valeur de ces dernières étant susceptibles de varier en cours d'expérience, il s'est avéré indispensable de calculer la quantité d'électricité traversant *g* durant l'électrophorèse.

On sait que la quantité d'électricité Q transportée par un courant d'intensité *i* du temps t_0 au temps t_1 est égale à :

$$Q = \int_{t_0}^{t_1} i.dt$$

Pratiquement, nous avons calculé cette quantité à l'aide de la formule suivante :

$$Q = \frac{1}{2} \Sigma (i_1 + i_2) \Delta t,$$

dont on peut déduire l'intensité moyenne du courant de fuite :

$$i_{moy.} = \frac{1}{2t} \Sigma (i_1 + i_2) \Delta t$$

Les symboles entrant dans ces expressions sont définis comme suit :

$\Delta t = t_2 - t_1$

i_1 = intensité mesurée au temps t_1

i_2 = intensité mesurée au temps t_2

t = durée de l'expérience

Localisation des fuites : On vidange le thermostat et on suit les variations de l'intensité du courant de fuite i_g au fur et à mesure de la baisse du niveau de l'eau. La hauteur de ce niveau correspondant à une brusque chute du courant de fuite permet d'identifier le rodage défectueux.

Pour que les variations d'intensité du courant de fuite soient nettement observables, il est nécessaire d'effectuer cette opération dans les conditions expérimentales suivantes :

1. — Le circuit principal i_6 est coupé afin d'accroître l'intensité i_g du courant de fuite (fig. 22 b).

2. — Il est indispensable de désolidariser la cellule du châssis (celle-ci ne reposant plus alors que sur son assise de caoutchouc) en éloignant les butées et lames métalliques de fixation latérale (fig. 23). En effet, l'espace compris entre ces dernières et les bords des rodages retient par capillarité une mince couche de liquide. Au niveau des rodages défectueux, cette couche liquide continue à assurer la fermeture du circuit de fuite après vidange complète du thermostat.

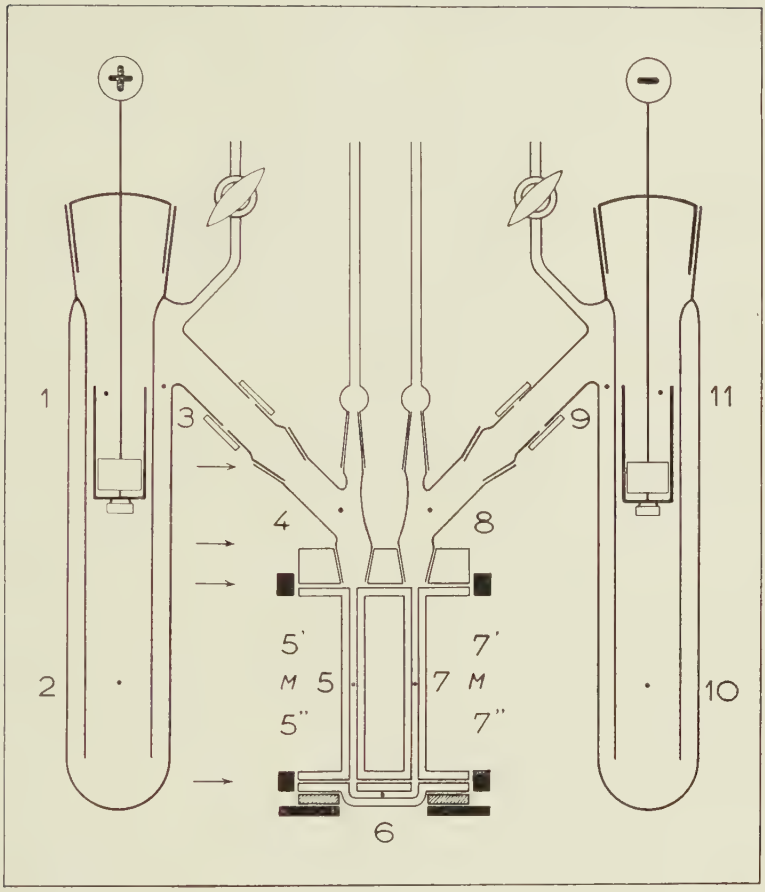


FIGURE 23. — Schéma de l'ensemble du dispositif cellule-vases à électrode

Les numéros désignent les différentes parties de la veine liquide (3 à 10 cm³) que l'on prélève en fin d'expérience et dont on détermine le pH. Lorsque le ménisque de séparation sol. tampon/sol. protéique (M) occupe le milieu de la branche ascendante 5 ou 7, on procède au prélèvement de la solution tampon en 5′ ou en 7′, et à celui de la solution protéique en 5″ ou en 7″.

Les flèches indiquent les divers niveaux des fuites électriques éventuelles.

Les rectangles pleins représentent les quatre lames de fixation et le socle du châssis métallique.

Les deux rectangles hachurés correspondent à l'assise en caoutchouc de la cellule.

Les deux robinets représentés sur ce schéma permettent la mise en communication de cet ensemble avec le système de compensation. Le tampon frais apporté par compensation ne détermine aucune perturbation supplémentaire de pH au niveau des secteurs 4, 5, 6, 7 et 8.

Il va de soi qu'en l'absence de ces pièces métalliques, le courant de fuite s'établit entre le rodage défectueux et le châssis à travers l'eau du bac. Il en résulte un accroissement des résistances de fuite (r', r'') qui abaisserait i_g si cet effet n'était contrebalancé par l'accroissement de la f. é. m. liée à la coupure du circuit i_g.

Cette technique nous a permis de constater que, dans la majorité des cas, les rodages situés dans la partie supérieure du dispositif sont à l'origine des fuites. On conçoit aisément qu'il en soit ainsi en raison des efforts mécaniques auxquels ceux-ci sont soumis. La figure 22 a été établie en tenant compte de cette localisation des fuites.

Fuites en haut de cellule et variations de pH en cours d'électrophorèse : L'étude systématique des variations de pH en cours d'électrophorèse a été poursuivie dans le cadre de nos recherches sur le comportement électrophorétique des hémoglobines en tampon cacodylique de faible force ionique.

Après dialyse et immédiatement avant la mise en électrophorèse, les pH du tampon et de la solution d'hémoglobine dialysée contre celui-ci ont été mesurés à l'aide d'un pH-mètre à électrode de verre (Cambridge Co).

En fin d'électrophorèse, des prélèvements de la veine liquide ont été effectués, à l'aide d'une seringue, aux divers niveaux désignés par : 4, 5, 6, 7 et 8, sur le schéma du dispositif cellule-vases à électrode reproduit sur la figure 23.

Nous avons réuni sur le tableau XV un ensemble de données relatives à trois groupes d'expériences respectivement effectuées en tampon cacodylique de même force ionique ($\Gamma/2 = 0{,}018$) mais de pH voisin de 6,55, 7,30 et 10,30 (2). La figure 24 a été établie à partir de ces données.

L'examen des déterminations de pH effectuées en fin d'expérience dans les divers secteurs du dispositif à électrophorèse permet de faire les remarques suivantes :

1. — Les variations de pH dans les secteurs 4, 5, 6, 7 et 8 sont d'autant plus accusées que la quantité Q_e d'électricité débitée dans les circuits de fuite est plus élevée.

(2) Il y a lieu de signaler que les solutions tampons à forte concentration en ions OH^- que l'on utilise ici, sont presque totalement dépourvues de pouvoir tampon. La gamme de pH que l'on constitue avec des proportions variables d'acide cacodylique et de cacodylate de sodium est limitée par le pouvoir tampon de la protéine elle-même. Dans le cas de la carboxyhémoglobine humaine d'adulte, il y a lieu d'alcaliniser les milieux avec de la soude pour atteindre notamment des pH supérieurs à son pHi (7,5 en tampon cacodylique de force ionique = 0.018).

TABLEAU XV

Exp. N°	pH (1) initial à 20° C		pH à 20° C dans les secteurs N°												
			4	5		6	7		8	Durée de l'exp. (sec)	i_g moy. (mA)	Q_G (coulombs)	i_g moy. (mA)	(Coulombs) Q_g	$pH_T - pH_P$
	pH_T	pH_P		5′	5″	bas de cell.	7″	7′							
428	6,58	6,48	6,62	6,50		6,44	6,53		6,59	67.800	4,98	337,7	0,012	0,8	+ 0,04
423	6,58	6,48	6,74	6,52		6,48	6,53		6,64	80.700	4,98	403,3	0,084	6,8	+ 0,16
384	6,55	6,38	6,75	6,50	6,40	6,40	6,40	6,60	6,60	86.100	4,88	419,8	0,143	12,3	+ 0,20
376	6,52	6,42	8,30	6,64		6,50	6,52		6,60	82.800	4,88	404,1	0,166	13,7	+ 1,78
399	6,60	6,30	9,50	7,15	6,52	6,48	6,48	6,72	6,60	68.400	4,75	324,7	0,400	27,3	+ 2,90
370	7,04	6,94	7,22	7,10		7,10	7,27		7,60	78.600	4,94	388,1	0,058	4,6	+ 0,18
418	7,40	7,30	7,65	7,45		7,20	7,44		7,62	61.200	4,97	304,1	0,076	4,6	+ 0,25
403	7,33	7,17	7,44	7,35		7,28	7,22	7,30	7,35	80.400	4,92	395,4	0,135	10,9	+ 0,11
415	7,46	7,14	8,90	8,50		7,66	7,50		7,40	79.800	4,85	386,6	0,156	12,5	+ 1,44
425	10,22	10,17	10,15	—	9,62	9,68	9,75		10,02	61.500	3,14	193,2	0,029	1,8	— 0,07
407	10,08	9,82	9,60	9,00		8,60	8,66		8,76	66.900	4,26	285,0	0,050	3,3	— 0,48
406	10,25	10,17	9,40	8,05	8,20	8,05	8,59		8,52	86.400	3,17	273,8	0,046	3,9	— 0,85
408	10,28	10,16	9,22	8,62		7,70	8,62		9,20	71.100	3,29	234,3	0,106	7,6	— 1,06
387	10,60	10,36	9,44	8,37		8,10	8,50		8,44	83.700	4,93	412,7	0,156	13,1	— 1,16

(1) Il est à noter que sur la base de la loi de DONNAN, l'identité de signe de la différence : $pH_P - pH_T$, observée au cours d'expériences pratiquées en tampon de pH croissant de 6,5 à 10,6, paraît impliquer un pHi de la carboxyhémoglobine humaine inférieur à 6,5, alors que sa détermination par électrophorèse dans les mêmes milieux nous a conduit à établir sa valeur au voisinage de 7,5. Ceci tient à ce que les conditions expérimentales rigoureusement définies sont indispensables à la mesure de pHi par étude du potentiel de membrane [3].

2. — D'une manière générale, les pH les plus élevés sont observés en 4, et la valeur absolue de la différence : $|pH_4 - pH_8|$, croît avec Q_g.

3. — Cette différence, positive dans le cas des tampons de pH acide ou légèrement alcalin, devient négative dans celui des tampons franchement alcalins.

4. — Le pH de la veine liquide passe par un minimum au niveau du secteur 6, zone de plus forte concentration en protéine et, par là, de pouvoir tampon le plus élevé.

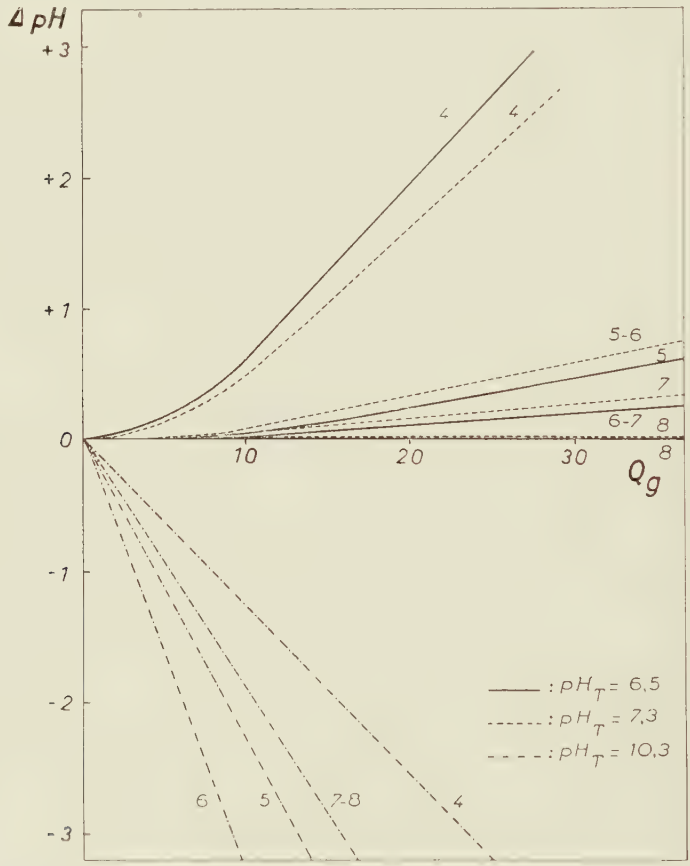


FIGURE 24. — Allure des courbes représentant la variation de pH (Δ pH) constatée en fin d'expérience dans les divers secteurs 4, 5, 6, 7 et 8 de la cellule à électrophorèse, en fonction de la quantité d'électricité débitée par le courant de fuite (Q_g)

Δ pH = différence entre le pH moyen initial et le pH moyen final, le premier étant, en 4 et 8 celui du tampon, en 6 celui de la solution protéique et la moyenne du pH de ces deux solutions en 5 et en 7.

5. — On observe, le plus souvent, un deuxième maximum de pH dans le secteur 8, mais il est nettement moins accentué que celui se manifestant dans le secteur 4.

L'existence d'une relation de cause à effet entre l'établissement de fuites au niveau du haut de cellule et les modifications de pH observées en fin d'électrophorèse a été confirmée par le dispositif très simple (fig. 25) constitué par un tube en U immergé dans un bac rempli d'eau distillée et dont les extrémités, formant pont, sont en communication avec les vases à électrode. Des fuites de localisation analogue à celles se produisant dans le haut de cellule (*a* et *b* de la fig. 22) ont été réalisées en sectionnant les deux branches du tube et en les raccordant au moyen de manchons de cellophane. Le pôle négatif du générateur est, par ailleurs, relié à une troisième électrode plongeant dans le bac intermédiaire ; cette dernière joue le rôle de la cathode de fuite (châssis) dans l'appareil à électrophorèse de Tiselius-Svensson. Le tube en U et les deux vases à électrode sont remplis du tampon cacodylique de force ionique 0,018 utilisé au cours de nos électrophorèses.

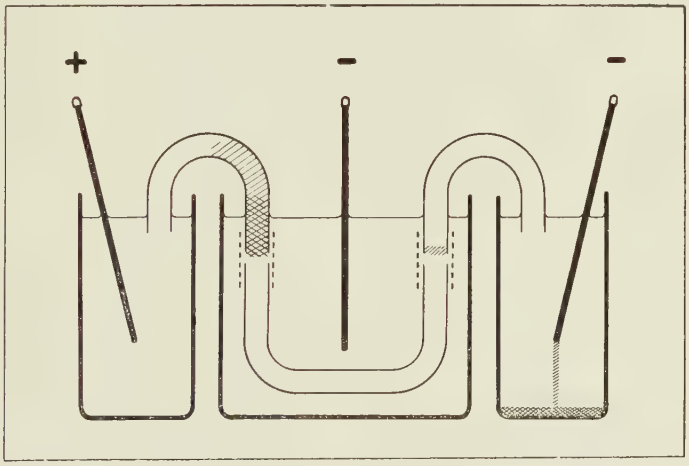


Figure 25. — Mise en évidence de zones alcalines à la phénolphtaléine (zones hachurées) au niveau des fuites électriques (manchons de cellophane représentés en pointillés), et au niveau de la cathode principale. Les trois électrodes sont en carbone

L'addition de phénolphtaléine au tampon de pH = 6,5 permet de constater, après 30 minutes de passage d'un courant de 15-20 mA sous 400 volts dans le circuit principal et de 10 à 15 mA dans les circuits dérivés, une alcalinisation très nette de la veine liquide au niveau du manchon anodique. Une alcalinisation fugace apparaît dans le manchon cathodique, tandis que l'eau contenue dans le bac demeure neutre dans son ensemble (neutralisation par CO_2 atmosphérique dissous).

Dans le cas d'un tampon alcalin (pH = 9) et dans des conditions expérimentales analogues aux précédentes, le même indicateur met en évidence une baisse du pH de la veine liquide contenue dans l'ensemble du tube U.

b) *Discussion*

Les variations localisées de pH observées en fin d'électrophorèse au cours desquelles des courants de fuite ont pris naissance dans le haut de cellule peuvent être interprétées par une étude des phénomènes électrolytiques et dialytiques dont les fuites sont le siège.

La fixation de la cellule (haut de cellule, cellule intermédiaire et bas de cellule) sur le châssis est assurée par des lames métalliques dont certaines sont en contact étroit avec les platines et joints rodés unissant les trois parties de la cellule (fig. 23 et 26). Ces lames, solidaires du châssis, ont une polarité négative en raison du montage précédemment décrit et schématisé par la figure 22 *b*). Nous les avons représenté sur cette dernière comme appartenant à un système d'électrodes dans lequel elles se comportent nécessairement comme des *cathodes polarisables*, alors que, dans les canaux de fuite, la jonction : eau du thermostat/tampon d'électrophorèse, doit être considérée comme impolarisable. Il

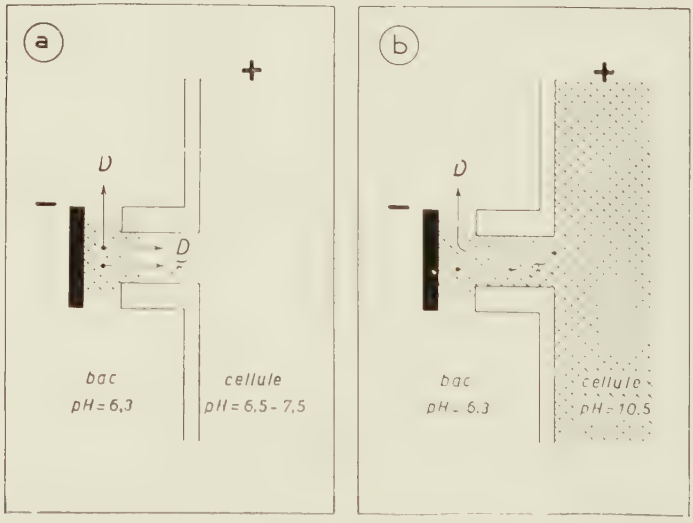


FIGURE 26. — Représentation schématique des phénomènes électrolytiques et dialytiques siégeant au niveau d'un rodage plat défectueux de la cellule à électrophorèse ; en milieu acide ou faiblement alcalin (*a*) et en milieu alcalin (*b*)
Rectangle plein : lame métallique de fixation latérale.
Partie hachurée : zone alcaline.
D : vecteur de diffusion.
F : champ électrique de fuite.

importe de souligner, par ailleurs, que ces canaux de fuite peuvent être le siège d'échanges ioniques ou moléculaires entre les deux milieux, par dialyse ou électro-migration.

On peut dès lors, aborder l'analyse des phénomènes électrolytiques se manifestant au niveau de ce système, en l'assimilant à un voltamètre.

Une partie des ions alcalins du tampon traverse les canaux de fuite et va se décharger au niveau de la cathode du voltamètre en donnant lieu à la formation de l'hydroxyde correspondant. Dans le cas d'un tampon à base de sels de sodium, on peut évaluer comme suit la quantité de soude formée :

Le nombre de coulombs transportés par un courant de fuite de 0,0002 ampères pendant 24 heures est égal à :

$$0{,}0002 \ . \ 86400 = 18 \text{ coulombs}$$

ce qui équivaut à la formation de :

$$18 \ . \ \frac{23000 \ . \ 40}{23 \ . \ 96500} = 8 \text{ mgr. de NaOH}$$

se libérant principalement au niveau des lames et butées métalliques de fixation latérale, solidaires du châssis (cathode) (fig. 26 *a*).

Une certaine quantité des ions OH^- de la soude ainsi formée va pénétrer par électromigration anodique dans la cellule au niveau de la fuite et y déterminer une zone alcaline qui aura tendance à poursuivre sa migration vers l'anode du dispositif de Tiselius. A résistances de fuite égales, l'alcalinisation sera plus importante du côté des fuites anodiques. En effet nous avons établi que le courant dérivé de plus grande intensité est celui qui prend naissance au niveau de ces dernières.

Dans le cas particulier d'un tampon de forte concentration en ions OH^-, on doit constater une baisse générale du pH de la veine liquide (fig. 26 *b*). En effet, du fait de la grande différence de pH des milieux extérieurs (eau du thermostat) et intérieur (solution alcaline), des échanges dialytiques s'effectuent au niveau des fuites, tendant à équilibrer la répartition des ions oxhydriles par sortie de soude vers le milieu extérieur [3]. L'abaissement du pH qui en résulte est cependant ralenti au niveau des fuites qui sont le siège d'une électromigration prononcée.

(3) Nous avons pu confirmer la validité de cette hypothèse par une série d'expériences au cours desquelles le dispositif cellule-vases à électrode de l'appareil à électrophorèse n'a été rempli que de tampon cacodylique de pH = 10,3. De faibles défectuosités d'étanchéité des rodages, ne donnant lieu qu'à des fuites électriques de l'ordre de 50 μA se sont révélées suffisantes, en 20 heures et en *l'absence de tout courant,* à abaisser d'une demi unité le pH du contenu de la cellule. Par ailleurs, l'eau du bac n'accuse aucune modification de pH en raison de son volume considérable et de sa teneur en CO_2 atmosphérique dissous.

Si un tel effet ne se manifeste pas dans le dispositif expérimental simplifié, la baisse de pH d'un tampon alcalin étant alors aussi accentuée dans l'ensemble de la veine liquide qu'au niveau des manchons de cellophane, c'est vraisemblablement en raison de la trop grande surface de ceux-ci, permettant aux échanges dialytiques de l'emporter sur les phénomènes d'électromigration.

Ce premier essai d'interprétation des faits observés, mettant en jeu les phénomènes électrolytiques se manifestant sans aucun doute au niveau des cathodes polarisables et des effets dialytiques confirmés par l'expérience, est incomplet en ce qu'il ne tient pas compte du rôle éventuellement joué par le potentiel électrocinétique négatif de la paroi des capillaires de fuite à la fois dans le transport des ions et dans l'établissement d'un flux liquide électro-osmotique [17, 18]. Il est possible que la charge négative de ces parois favorise l'alcalinisation du côté anodique en modifiant le nombre de transport des ions et détermine un flux électroendosmotique vers l'anode.

Nous n'avons pas rapporté, au cours de ce travail, l'effet de fuites importantes se produisant dans le bas des cellules. Beaucoup moins fréquentes que celles étudiées ici, elles s'accompagnent de perturbations affectant les frontières protéiques dans les deux branches de la cellule, en sorte que les expériences sont irrémédiablement perdues.

Par contre, les fuites de haut de cellule, qui déterminent des gradients de pH d'autant plus accentués qu'elles sont plus importantes, sont compatibles avec de très bons enregistrements. Le calcul des mobilités doit nécessairement tenir compte de la valeur exacte de ces gradients de pH et peut être opéré selon le principe défini p. 65 et fig. 16. On peut admettre que l'établissement de ces gradients ait un effet sur la séparation de constituants protéiques comme tel est le cas de ceux créés par Kolin [58, 59] dans des conditions expérimentales différentes.

Le Docteur H. Svensson nous a proposé récemment d'utiliser des raccords de haut de cellule d'un nouveau type. Les rodages coniques se raccordant aux vases à électrodes sont supprimés. Ce dispositif permet de diminuer très notablement les variations de pH dans les secteurs 4 et 8.

2. Détermination de la charge de l'ion hémoglobinique en tampon CACO, Cl ; I = 0,0175 ; pH = 6,5.

Nous avons utilisé la relation 4 a [42] (voir p. 43) de Hoch avec les paramètres suivants :

$M = 66800$

$U_3 = +5{,}0 \cdot 10^{-5}$; $(C'_1)_3 = 0{,}57$ g. p. 100 ml.

$U_4 = +5{,}1 \cdot 10^{-5}$; $(C'_1)_4 = 0{,}15$ g. p. 100 ml.

$K = 0{,}128$
$\alpha\ cacoH = 2{,}24 \,.\, 10^{-2}$
$\alpha\ cacoNa = 1$

Les mobilités ioniques sont consignées dans le tableau XVI.

On trouve :
$B(\bar{U})_3 = +\ 0{,}00653 \,.\, 10^{-3}$
$(Qs)_3 = z_3/M = +\ 0{,}84 \,.\, 10^{-4}$ équiv. /g.
$z_3 = +\ 5{,}6$ sans terme correctif C.
$z_3 = +\ 5{,}34$ avec terme correctif C.
$z_4 = +\ 5{,}45$ avec terme correctif C.

Il en résulte une différence de charge entre les deux fractions *3* et *4* égale à :

$$\Delta z = 0{,}11$$

TABLEAU XVI

Mobilités ioniques à dilution infinie, $\theta = +\ 2^\circ$ C

IONS	Mobilités $U \,.\, 10^4 \,.\, cm^2 \,.\, volt^{-1} \,.\, sec^{-1}$	Références
H^+	24,5	1
K^+	4,34	1
Na^+	2,72	1
OH^-	— 12,8	1
Cl^-	— 4,43	1
$\frac{1}{3}[OOC-CH_2-\dot{C}(OH)(\dot{C}OO)-CH_2-COO]^{--}$	— 3,8	4
$\frac{1}{2}[PO_4H]^{--}$	— 2,3	2,3
$[CH_3COO]^-$	— 2,17	2,4
$[PO_4H_2]^-$	— 1,73	2
$[CO < \begin{matrix} N-CO \\ NH-CO \end{matrix} > C=(C_2H_5)_2]^-$	— 1,5	5
$[(CH_3)_2=As=O]^-$ (O)	— 1,42	6

Références. — 1 : Déterminée à partir de Λ_∞ F [13]
2 : Extrapolée [77]
3 : Extrapolée [62]
4 : Interpolée [21]
5 : Extrapolée [7]
6 : Déterminée par conductimétrie (cf. p. 72).

Nous avons établi la relation suivante entre la valence z de l'ion hémoglobinique majoritaire (fraction *3*) et sa mobilité U :

$$z_3 = 1{,}068 \,.\, U \,.\, 10^{-5}$$

Les seules données concernant la carboxyhémoglobine humaine adulte dans la littérature sont celles rapportées par Scheinberg et coll. [98] :

à pH 3,0 : z = + 88
pH 4,0 : z = + 47
pH 12,0 : z = — 67

et celle que nous avons déterminée à partir des données expérimentales de Beaven et coll. [15] avec une mobilité $\bar{U}_A = -3{,}12 \,.\, 10^{-5}$ en tampon PO_4^{--} :

à pH 8,2 et I = 0,03 : z = — 4,69

L'étude de l'équilibre dialytique ne permet pas de déterminer la charge de l'ion hémoglobinique selon l'équation (40) de Svensson [106]. Cet équilibre est perturbé par les combinaisons protéine-anions à l'étude desquelles nous avons consacré le chapitre II de ce travail.

CHAPITRE II

RELATIONS ENTRE LES INCREMENTS DE CONDUCTIVITE MESURES EN FIN DE DIALYSE ET LES ANOMALIES DE FRONTIERE — INTERPRETATION

I. — Résultats expérimentaux

Le phénomène anormal dont nous abordons l'étude se manifeste dans les deux branches de la cellule à l'interface protéine/tampon, mais affecte essentiellement le diagramme enregistré dans la branche descendante où il se traduit par une discontinuité caractéristique désignée par ζ sur la figure 27. Une anomalie semblable est très nettement apparente sur les diagrammes enregistrés aux pH inférieurs au pH isoélectrique de l'ovalbumine (LONGSWORTH [65], fig. 8, p. 285), de la β — lactoglobuline (OGSTON et TILLEY [78], fig. 1, p. 646), et de l'hémoglobine humaine (SHAVIT et BREUER [99], fig. 1, p. 242 ; fig. 2 et 3, p. 243). Cependant, elle n'est mentionnée par aucun des auteurs précités et seul LONGSWORTH [65] se borne à souligner la dissymétrie de ses diagrammes.

Des recherches préliminaires nous ont conduit à constater que cette anomalie est d'autant plus accusée que les différences de conductivité observées, en fin de dialyse, entre le tampon et la solution protéique ($(\Delta\varkappa)_D$) et, en fin d'électrophorèse, au niveau de la frontière mobile M ($(\Delta\varkappa)_M$) et au niveau des frontières stationnaires δ et ε ($(\Delta\varkappa)\ \delta$ et $(\Delta\varkappa)\ \varepsilon$), s'écartent davantage des valeurs calculées sur la base des données de DOLE [36], LONGSWORTH [70] et SVENSSON [106]. Nous avons dès lors cherché à vérifier l'existence

d'une relation de cause à effet entre l'affinité de la protéine pour les anions et ces deux phénomènes par l'étude comparée de l'influence des mêmes paramètres — susceptibles de modifier cette affinité — sur les incréments et les gradients de réfraction.

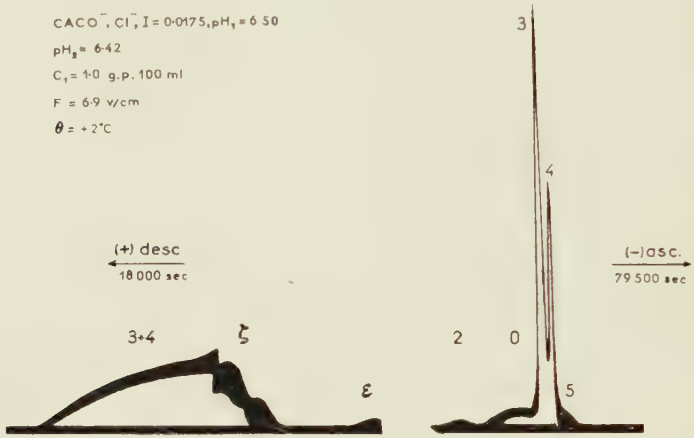


FIGURE 27. — Diagrammes d'électrophorèse (appareil de TISELIUS-SVENSSON ; L. K. B. Produkter, Stockholm) : frontières *3* et *4*, carboxyhémoglobine humaine adulte COHb A ; frontière *2* et *0*, protéines d'accompagnement ; frontière ζ et *5*, anomalies

A. — ETUDE DES INCRÉMENTS DE CONDUCTIVITÉ.

Nous étudierons successivement les incréments de conductivité

$$(\Delta\varkappa)_D, (\Delta\varkappa)_\delta, (\Delta\varkappa)_\varepsilon \text{ et } (\Delta\varkappa)_M.$$

1. — *Etude de* $(\Delta\varkappa)_D$

L'incrément $(\Delta\varkappa)_D = \varkappa_2 - \varkappa_1$ est celui défini par la différence entre les conductivités des milieux tampon (1) et protéique (2) après dialyse, ou d'une manière plus générale, entre les milieux (1) et (2) situés respectivement au-dessus et au-dessous de la frontière initiale de chacune des deux branches. La valeur de cet incrément est donnée par l'équation suivante, établie par SVENSSON [106] à partir des lois de DONNAN :

$$(\Delta\varkappa)_D = \varkappa_2 - \varkappa_1 = FC\left[U - \frac{1}{2I}\sum z_i c_i u_i\right] \qquad (1)$$

et dans laquelle $\varkappa$ = conductivité en mho/cm., **F** = 96480 coulombs, C = concentration de la protéine en équival. électrochimiques/ml., affectée du signe de la charge, U = mobilité de la protéine, I = force ionique (Γ/2), z_i, c_i et u_i représentent respectivement la valence, la concentration équivalente et la mobilité des ions i du tampon.

Le signe de l'incrément est précisé comme suit :

$$(\Delta\varkappa) > 0 \begin{cases} \text{si } U \text{ est de signe contraire à } \Sigma\, z_i\, c_i\, u_i, \text{ cas où les ions de même signe que le colloïde sont plus lents que les ions compensateurs.} \\ \text{si } U \text{ est de même signe que } \Sigma\, z_i\, c_i\, u_i \text{ et que } U > \frac{1}{2I}\, z_i\, c_i\, u_i. \end{cases}$$

$$(\Delta\varkappa) < 0 \begin{cases} \text{si } U \text{ est de même signe que } \Sigma\, z_i\, c_i\, u_i \text{ et que } U < \frac{1}{2I}\, z_i\, c_i\, u_i. \end{cases}$$

L'équation (1) ne tient compte que des ions *libres* présents des deux côtés de la membrane. Aussi, la valeur théorique de $(\Delta\varkappa)_{D\ calc.}$ établie en faisant état de *tous* les ions présents dans les milieux (1) et (2), ne coïncide-t-elle avec la valeur expérimentale $(\Delta\varkappa)_{D\ obs.}$ que si tous les ions demeurent libres [19, 95, 103]. Dans le cas contraire — qui ne peut correspondre qu'à un blocage d'une partie des ions par la protéine — la conductivité $\varkappa_{2\ obs}$ est nécessairement inférieure à la conductivité $\varkappa_{2\ calc.}$

$$\varkappa_{2\,obs.} = F \sum [c_{i_2}]\, u_{i_2} + [C]\, U < F \sum c_{i_2}\, u_{i_2} + CU = \varkappa_{2\,calc.} \qquad (2)$$

inégalité dans laquelle $[c_{i_2}]$ et $[C]$ représentent respectivement les concentrations équivalentes des ions tampons et protéiques demeurés libres.

De telles combinaisons sont bien connues et doivent obéir à la loi d'action de masse. En d'autres termes, il est permis de s'attendre à ce que leur formation soit favorisée au cours de l'équilibre dialytique, par l'accroissement de la concentration protéique C_1 (concentration pondérale par volume de solution) ou de la force ionique I du tampon [1]. Elle doit en outre dépendre de la charge de l'ion protéique — et par là du pH du milieu — et d'une spécificité des ions salins liée notamment à leur valence.

On pouvait donc espérer déduire l'existence de telles combinaisons et préciser leur nature par l'étude systématique de l'influence de ces divers paramètres expérimentaux sur la valeur de $(\Delta\varkappa)_D$.

a) *Influence de la force ionique I avec C_1 = Cte.*

Les conditions expérimentales adoptées ont été les suivantes : dialyse de 5 jours à + 2° C en tube de cellophane (VISKING C°) d'un volume de solution de carboxyhémoglobine humaine adulte de

(1) Nous verrons ultérieurement qu'en cours d'électrophorèse l'effet de ces facteurs est plus complexe (§ II B. 1).

concentration moyenne C_1 = 0,96 g. p. 100 ml., contre 100 volumes de tampon de force ionique variable constitué par 2/3 ions Cl^- + 1/3 ions cacodyliques. De ces derniers, les 4/5 sont sous forme dissociée (cacodylate) et 1/5 sous forme non dissociée (acide cacodylique). Le cation commun est le sodium.

Le tableau XVII et la figure 28 rendent compte des résultats de cette étude. Il ressort de celle-ci qu'en milieux de force ionique croissante la valeur de $(\Delta\chi)_{D\ obs.}$ s'écarte régulièrement de celle de $(\Delta\chi)_{D\ calc.}$, en changeant de signe. L'examen de la courbe représentative de la fonction :

$(\Delta\chi)_{D\ obs.} = f(\sqrt{I})$, appelle les deux remarques suivantes :

1° Cette courbe ne passe pas par l'origine. Aux très faibles forces ioniques (I = 0,005), $(\Delta\chi)_{D\ obs.}$ est légèrement supérieur à $(\Delta\chi)_{D\ calc.}$ la contribution de la protéine à la conductivité du milieu (2) étant alors appréciable.

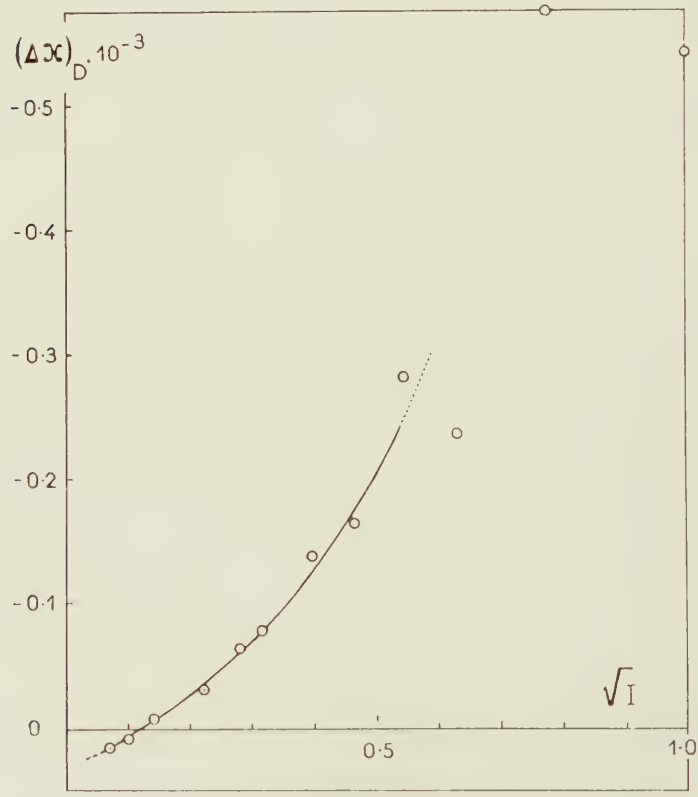


FIGURE 28. — Gradient dialytique de conductivité observé en fonction de la force ionique I du tampon (COHb A, 1 g. p. 100 ml., dialysée contre le tampon caco.—, Cl—, pH 6,5, rapport dialytique 1/100, durée de la dialyse 5 jours, θ = + 2° C)

2° Aux forces ioniques très élevées (supérieures à 0,3), les milieux (1) et (2) ont des résistances R_1 et R_2 faibles et trop voisines pour que $(\Delta\chi)_{D\ obs.}$, déterminé à partir de leur valeur, soit significatif. Aussi le tracé de la courbe a-t-il été interrompu au niveau de $\sqrt{I} = 0{,}55$. En fait, ce tracé devrait ultérieurement s'infléchir car $U \longrightarrow \frac{1}{2I} \Sigma\, c_i\, z_i\, u_i = cte$, d'où $(\Delta\chi)_{D\ obs.} \longrightarrow 0$.

TABLEAU XVII

I (1)	$\sqrt{I}$ (2)	R_1 (3)	$\chi_1 . 10^{-3}$ (4)	R_2 (5)	$\chi_2 . 10^{-3}$ (6)	$(\chi_2 - \chi_1)$ obs. 10^{-3} (7)	$(\chi_2 - \chi_1)$ calc. 10^{-3} (8)*	pH_1 20° C (9)	pH_2 20° C (10)	$pH_2 - pH_1$ 20° C (11)
0,005	0,0707	8337	0,286	7938	0,300	+ 0,014	+ 0,012	6,52	6,32	— 0,20
0,010	0,1000	4538	0,546	4299	0,555	+ 0,009	+ 0,011	6,55	6,38	— 0,17
0,020	0,1414	2250	1.058	2267	1,050	— 0,008	+ 0,007	6,58	6,46	— 0,12
0,050	0,2236	936	2,543	948	2. 511	— 0,032	+ 0,0044	6,54	6,48	— 0,06
0,080	0,2828	606	3,927	616	3,864	— 0,063	+ 0,0033	6,54	6,41	— 0,13
0,100	0,3163	490	4,857	498	4,779	— 0,078	+ 0,0027	6,54	6,41	— 0,13
0,160	0,4000	320	7,438	326	7,301	— 0,137	+ 0,0017	6,52	6,45	— 0,07
0,220	0,4690	240	9,917	244	9,754	— 0,163	+ 0,0011	6,52	6,39	— 0,13
0,300	0,5475	182	13,077	186	12,796	— 0,281	—	6,52	6,41	— 0,11
0,400	0,6325	141	16,879	143	16,643	— 0,236	—	6,50	6,38	— 0,12
0,600	0,7745	92	25,870	94	25,319	— 0,551	—	6,49	6,40	— 0,09
1,000	1,0000	66	36,061	67	35,522	— 0,539	—	6,49	6,46	— 0,03

(*) Incrément calculé à partir de l'équation (1) dans laquelle intervient la mobilité électrophorétique U de l'ion protéique. La détermination de cette dernière n'est possible qu'à des forces ioniques inférieures ou égales à 0,220, valeur au-dessus de laquelle l'énergie mise en jeu ne peut être dissipée sans engendrer des courants de convection [7].

b) *Influence de la nature de l'anion à concentration protéique C_1 variable.*

Le tableau XVIII précise les caractéristiques des tampons contre lesquels les échantillons de COHb A à diverses concentrations C_1 ont été dialysés dans les conditions standards adoptées (5 jours de dialyse à + 2° C, rapport dialytique = 1/100). Le tableau XIX fournit un exemple du calcul de l'incrément de conductivité $(\Delta\chi)_{D\ calc.}$ dans le cas du tampon : $caco^-$, Cl^- ; I = 0,0175 ; pH = 6,5. Les valeurs ainsi obtenues ont été rassemblées dans le tableau XVIII qui permet de comparer, pour chaque tampon, les valeur calculées et observées de $(\Delta\chi)_D$. Ces dernières sont déduites des graphiques reproduits sur les figures 29 et 30 (coefficient angulaire des droites représentatives des fonctions $(\Delta\chi)_{D\ obs.} = f\ (C_1)$). Ces figures illustrent l'influence manifeste de la nature des anions sur l'équilibre dialytique. On constate que $(\Delta\chi)_{D\ obs.}$ est toujours inférieur à $(\Delta\chi)_{D\ calc.}$ et qu'en gros ces deux valeurs présentent un écart d'autant plus accusé que la valence de

TABLEAU XVIII

TAMPON				$(\chi_2 - \chi_1)$ calc. $10^{-3} . C_1$	$(\chi_2 - \chi_1)$ obs. 10^{-3}	$(\chi_2 - \chi_1)$ calc. $-(\chi_2 - \chi_1)$ obs. $. 10^{-6}$ avec $C_1 = 1$
Nature	I	pH_1 à 20° C	$\chi_1 . 10^{-3}$ à 2° C			
(1) acéto-acétique ..	0,010	4,68	0,470	+ 0,017	+ 0,015 (C_1 — 0,05)	2,7
(2) acéto-acétique ..	0,0175	5,06	0,775	+ 0,014	— 0,0034 C_1	17,4
(3) caco—, Cl—	0,0175	6,55	0,973	+ 0,00738	— 0,012 (C_1 — 0,5)	13,4
(4) mono et diphos.	0,012	6,46	0,703	— 0,0038	— 0,0154 (C_1 — 0,35)	13,8
(5) mono et diphos.	0,0175	6,32	0,920	— 0,0045	— 0,0216 C_1	26,1
(6) citrique	0,0175	6,63	0,448	+ 0,001	— 0,0340 (C_1 — 0,44)	20,0
(7) di-éthyl-barbi. ..	0,0212	8,64	0,789	— 0,001	— 0,0015 C_1	0,5

TABLEAU XIX

C_1 (g. p. 100 ml)	C (10^{-7})	U_{moy} (10^{-5})	F. C (10^{-2})	$U - \frac{\Sigma z_i c_i u_i}{2 I}$ (10^{-5})	$\chi_2 - \chi_1$ (10^{-6})	$(\chi_2 - \chi_1)/C_1$ (10^{-6})
0,51	4,08	4,99	3,93	9,22	3,62	7,10
0,66	5,28	5,08	5,10	9,31	4,75	7,20
0,86	6,88	5,21	6,64	9,44	6,27	7,29
1,12	8,96	5,37	8,64	9,60	8,29	7,40
1,48	11,84	5,60	11,42	9,83	11,22	7,58
1,71	13,67	5,74	13,18	9,97	13,14	7,68
				$(\chi_2 - \chi_1)$moy.		7,38 $10^{-6} . C_1$

l'anion est plus élevée. Par ailleurs, comme Svensson [106] l'a déjà observé, l'incrément de conductivité peut s'annuler à des concentractions en protéine égales ou inférieures à 0,5 g. p. 100 ml. Enfin, il apparaît que l'influence de la force ionique sur la divergence de $(\Delta\chi)_{D\ calc.}$ et de $(\Delta\chi)_{D\ obs.}$ précédemment étudiée dans le cas du tampon cacodylique, s'exerce identiquement quelle que soit la nature de l'anion choisi (acétate, cacodylate, mono- et diphosphate)

c) *Influence du pH à concentration protéique C_1 variable.*

Trois séries de dilution d'une préparation de carboxyhémoglobine ont été respectivement dialysées, dans les conditions standard adoptées, contre les tampons 2, 3 et 7 du tableau XVIII. Ces derniers ne renferment que des anions monovalents et, à force ionique voisine, présentent respectivement des pH de 5,06, 6,55 et 8,64. Il ressort de la comparaison des résultats expérimentaux reproduits dans le tableau XVIII et sur la figure 31 que la diver-

gence manifestée entre les valeurs observées et calculées de $(\Delta\varkappa)_D$ diminue lorsque le pH s'élève et tend à s'annuler à partir de pH = 8,64.

2. *Etude de* $(\Delta\varkappa)_\delta$ *et* $(\Delta\varkappa)_\varepsilon$

En désignant par $\varkappa'$ et $\varkappa''$ la conductivité des solutions « ajustées » contenues, l'une dans la branche ascendante, l'autre dans la branche descendante de la cellule à électrophorèse, les incréments de conductivité au niveau des frontières stationnaires sont définis par :

$$(\Delta\varkappa)_\delta = \varkappa_2 - \varkappa' \quad \text{et} \quad (\Delta\varkappa)_\varepsilon = \varkappa'' - \varkappa_1$$

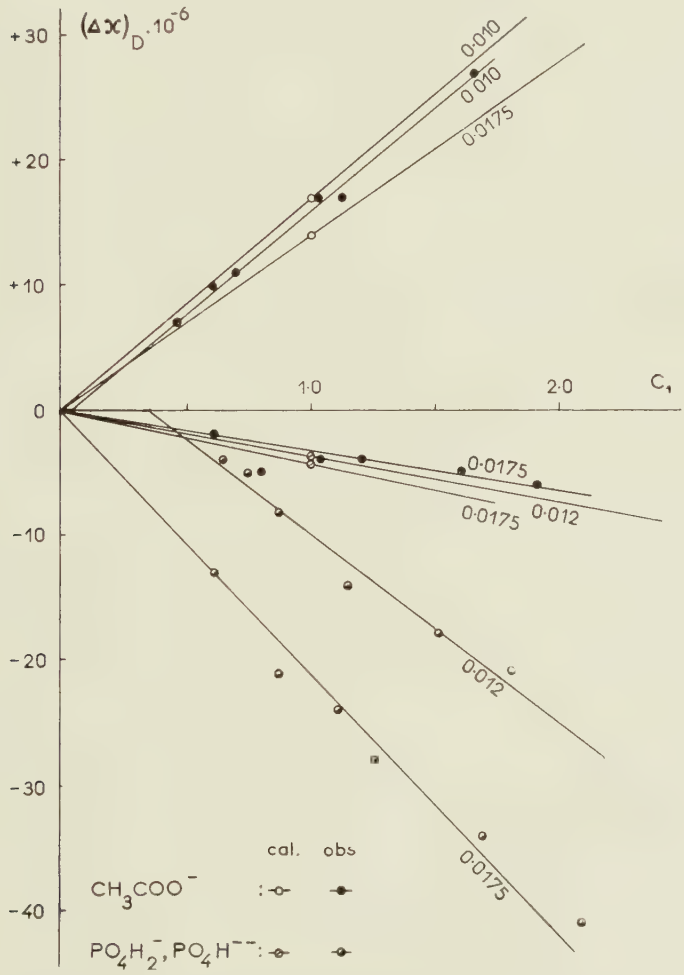


FIGURE 29. — Gradient dialytique de conductivité calculé et observé en fonction de la concentration C_1 (exprimée en g. p. 100 ml.) de COHb A et de la force ionique du tampon à $\theta = +2°$ C (cf. tableau XVIII)

La valeur de l'incrément relatif de conductivité est donnée, pour la branche ascendante, par l'équation (43) de Svensson [106] :

$$\left(\frac{\Delta \varkappa}{\varkappa}\right)_{\delta} = \frac{\varkappa_2 - \varkappa'}{\varkappa'} = \frac{B_2 - B_1}{B_1} = \frac{1}{B_1}\left[B_{coll} - \frac{C}{2I}\sum \frac{z_i c_i}{u_i}\right] \qquad (3)$$

dans laquelle, B_1, B_2 et B_{coll} désignent respectivement la « beharrliche funktion » du tampon (fonction de Kohlrausch), de la solution protéique et de la protéine.

Le signe de cet incrément est précisé comme suit :

$\left(\frac{\Delta \varkappa}{\varkappa}\right)_{\delta} > 0$ cas général où $B_2 > B_1$ (équation (42) [106]) ;

$\left(\frac{\Delta \varkappa}{\varkappa}\right)_{\delta} = 0$ cas particulier où la solution « ajustée » d'une expérience précédente est soumise à l'électrophorèse dans une partie aliquote du même tampon [61, 70, 42], réalisé quand $U = \frac{\Pi u_i}{\Sigma u_i}$ (moyenne harmonique).

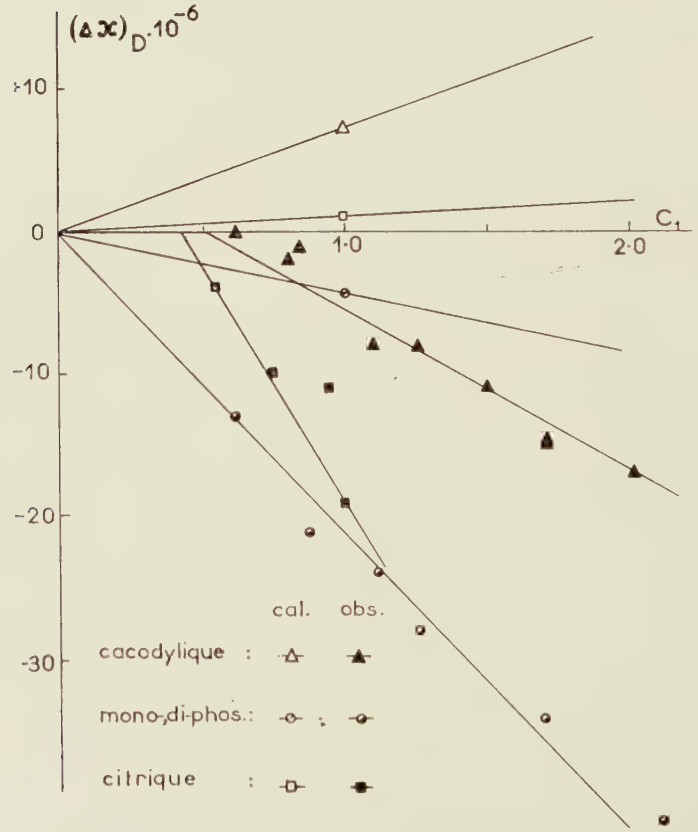


Figure 30. — Gradient dialytique de conductivité calculé et observé en fonction de la concentration C_1 (exprimée en g. p. 100 ml.) de COHb A et de la nature des anions du tampon à force ionique constante (I = 0,0175) et à pH constant (pH = 6,5) à $\theta = +2°$ C (cf. tableau XVIII)

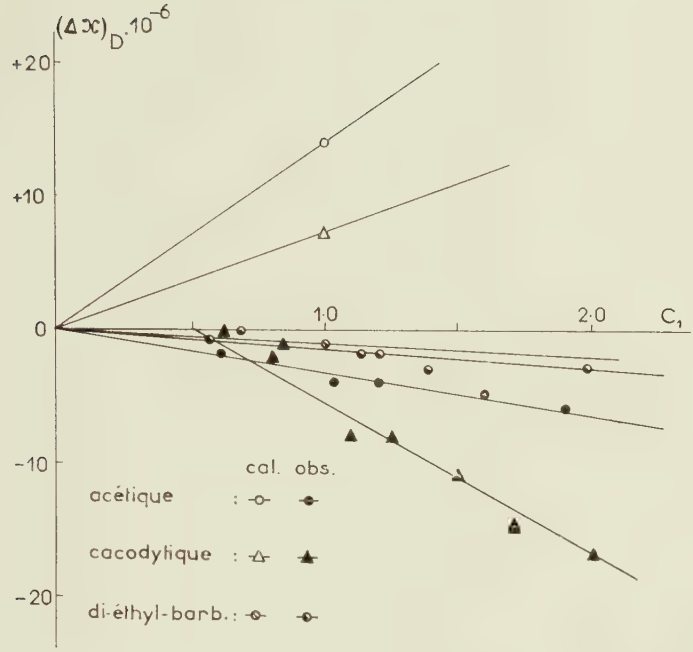


FIGURE 31. — Gradient dialytique de conductivité calculé et observé en fonction de la concentration C_1 (exprimée en g. p. 100 ml.) de COHb A et du pH du tampon (anions monovalents) à force ionique constante (I = 0,0175). pH 20° C acétique = 5,06 ; cacodylique = 6,55 ; diéthyl-barbiturique = 8,64 (cf. tableau XVIII)

Aux incréments de conductivité se manifestant au niveau des frontières stationnaires δ et ε correspondent des gradients réfractométriques qui leur sont proportionnels, en sorte que l'étude de leurs variations peut être indifféremment entreprise par des méthodes conductimétriques ou optiques. Ces dernières sont plus utilement applicables à l'étude de δ qui répond seule à la superposition d'un gradient de concentration saline et d'un gradient de concentration protéique et est, de ce fait, toujours plus accusé qu'ε.

Les incréments $(\frac{\Delta \chi}{\chi})\,\delta$ et $(\frac{\Delta \chi}{\chi})\,\varepsilon$ ont été étudiés par ces deux voies, en fin d'électrophorèses de COHb A effectuées en tampon cacodylique.

a) *Influence de la force ionique I à concentration protéique C_1 constante et pH = 6,5.*

En accord avec SVENSSON [106], les gradients δ et ε sont inversement proportionnels à la force ionique du tampon (fig. 32).

b) *Influence de la concentration protéique C_1 à pH = 6,5 et I = 0,0175.*

L'examen de la figure 33 permet de constater que les gradients réfractométriques $(\frac{dn}{dx})_{\delta}$ et $(\frac{dn}{dx})_{\varepsilon}$ sont directement proportionnels à C_1 et que la courbe représentative de leur variation est linéaire entre $C_1 = 0,7$ et $C_1 = 1,7$ g/100 ml.

Par ailleurs, les incréments relatifs $(\frac{\Delta \varkappa}{\varkappa})_{\delta\ obs.}$ et $(\frac{\Delta \varkappa}{\varkappa})_{\delta\ calc.}$ sont pratiquement identiques. En effet, un ensemble de résultats expérimentaux (cf. tab. XX) nous a permis d'établir que $(\Delta \varkappa)_{\delta\ obs}$ est lié à C_1 par la relation linéaire suivante : $(\varkappa_2 - \varkappa')_{obs} = 0,126 . 10^{-3} . C_1$ et que la valeur de l'incrément relatif $(\frac{\varkappa_2 - \varkappa'}{\varkappa'})_{obs}$ pour $C_1 = 1$ est égale à $\frac{0,126}{0,840} = 0,150$.

La valeur théorique de l'incrément relatif $(\Delta \varkappa)_{calc.}$ nous est fournie par l'équation (2). Le détail du calcul est le suivant :

Afin d'éliminer les erreurs expérimentales dans la détermination de la mobilité U de la protéine en fonction de la concentration C_1, nous avons adopté la valeur moyenne de U. On obtient par extrapolation : $U_{C_1 = 0} = 4,67 . 10^{-5}$ et l'incrément $\Delta U_{C_1 = 1} = 0,625 . 10^{-5}$. On obtient dont : U moy. = $(4,67 + \Delta U . C_1)\ 10^{-5}$.

C/U devient une fonction linéaire de C_1 et prend pour valeur moyenne : $C/U = 1,600 . 10^{-2}\ C_1$.

On a d'autre part :

$$\frac{\sum \frac{z_i c_i}{U_i}}{2I} C = -25,71 . 8.10^{-7} . C_1 = -205,68 . 10^{-7}\ C_1,$$

valeur négligeable vis-à-vis de C/U.

L'incrément $(\Delta \varkappa)$ calc. déterminé à partir de l'équation (3) a pour valeur : $\left(\frac{\Delta \varkappa}{\varkappa}\right)_{\delta\ calc.} = \frac{1}{0,1277}\left[1,600.10^{-2} . C_1 + 205,68.10^{-7} . C_1\right]$

d'où : $\left(\frac{\Delta \varkappa}{\varkappa}\right)_{\delta\ calc.} = 0,125$ pour $C_1 = 1$

c) *Influence du pH à concentration protéique C_1 et force ionique constantes :*

Le pH n'a aucune influence sur la valeur des gradients réfractométriques δ et ε qui demeure constante (fig. 34). En d'autres termes, les gradients de conductivité correspondants conservent la même valeur quelle que soit la charge de l'ion protéique.

3. *Etude de* $(\Delta\varkappa)_M$

Cette étude a pour objet de comparer, d'une part, les incréments de conductivité calculés et observés au niveau des frontières ascendantes, et, d'autre part, les diagrammes conductimétriques et réfractométriques enregistrés dans les deux branches.

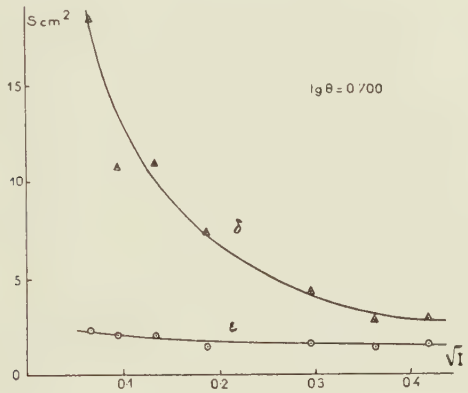


FIGURE 32. — Surface des gradients δ et ε observée en fonction de la force ionique I après 200-300 minutes d'électrophorèse de COHb A (C_1 = 1 g. p. 100 ml.) dans caco.—, Cl—; I = 0,0175, pH = 6,5. θ = angle de la fente oblique

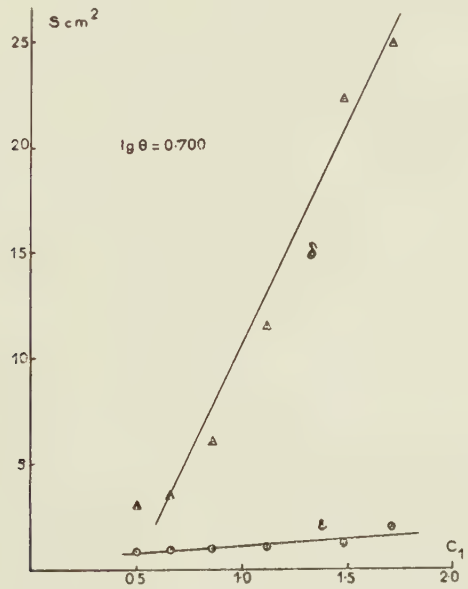


FIGURE 33. — Surface des gradients δ et ε observée en fonction de la concentration C_1 (exprimée en g. p. 100 ml.) de COHb A après 200-300 minutes d'électrophorèse dans caco.—, Cl—; I = 0,0175, pH = 6,5. θ = angle de la fente oblique

TABLEAU XX

C_1	% MetHb	R_2	$\varkappa_2$ (10^{-3})	R'	$\varkappa'$ (10^{-3})	$\varkappa_2 - \varkappa'$ (10^{-3})	$\varkappa_2 - \varkappa' / C_1$ (10^{-3})
0,51	7	2454	0,970	2627	0,906	0,064	0,1265
0,86	6	2439	0,976	2779	0,856	0,120	0,140
1,12	5	2460	0,967	2890	0,824	0,143	0,1287
1,48	4	2470	0,964	2992	0,795	0,169	0,1141
1,71	5	2480	0,960	3191	0,746	0,214	0,125
					$(\varkappa_2 - \varkappa')$ moy. = 0,126 . 10^{-3} . C_1		

a) $(\Delta\varkappa)_{M\ obs.}$ *et* $(\Delta\varkappa)_{M\ calc.}$:

L'incrément $(\Delta\varkappa)_M$ pour la branche ascendante est défini par la différence entre les conductivités des milieux immédiatement supérieur et immédiatement inférieur à la frontière M, c'est-à-dire entre les conductivités $\varkappa_1$ et $\varkappa'$ dans le cas d'une frontière unique.

$$(\Delta\varkappa)_M = \varkappa_1 - \varkappa' = (\Delta\varkappa)_D - (\Delta\varkappa)_\delta \qquad (4)$$

La valeur de l'incrément relatif est fournie par l'équation (14) de Svensson [105] :

$$\frac{\Delta\varkappa}{\varkappa} = -\frac{B_{coll}}{B_1}$$

Le signe de cet incrément est toujour négatif.

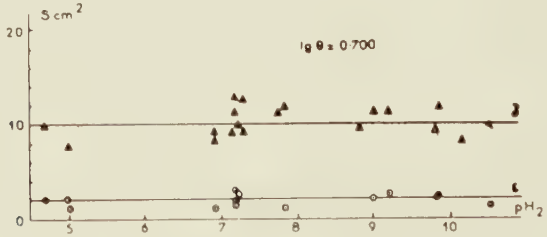


Figure 34. — Surface des gradients δ et ε observée en fonction du pH de la solution protéique (COHb A, C_1 = 1 g. p. 100 ml.) après 200-300 minutes d'électrophorèse dans caco.—, Cl⁻; I = 0,0175. θ = angle de la fente oblique

L'équation (4) permet de déterminer indirectement $(\varkappa_1 - \varkappa')_{calc.}$ et $(\varkappa_1 - \varkappa')_{obs.}$ au moyen des relations expérimentales précédemment établies (§ I. A. 1. b. et 2. b.).

Avec la COHb A en tampon cacodylique (I = 0,0175; pH = 6.55; $\varkappa_1 = 0{,}973 . 10^{-3}\ ohm^{-1} . cm^{-1}$) ces relations sont les suivantes :

$$\left(\frac{\varkappa_2 - \varkappa'}{\varkappa'}\right)_{calc.} = 0{,}125 . C_1 \text{ (§ I. A. 2. b.).}$$

$(\chi_2 - \chi_1)_{calc.} = 0{,}00738 \,.\, 10^{-3} \,.\, C_1$ (§ I. A. 1. b. Tab. XVIII).

$(\chi_2 - \chi')_{obs.} = 0{,}126 \,.\, 10^{-3} \,.\, C_1$ (§ I. A. 2. b.).

$(\chi_2 - \chi_1)_{obs.} = 0{,}012 \,.\, 10^{-3}\ (C_1 - 0.5)$ (§ I. A. 1. b. Tab. XVIII).

En posant :

$$(\chi_1 - \chi')_{calc.} = \chi_1 - \quad \chi_1 - \left[\frac{\chi_1 + (\chi_2 - \chi_1)}{\dfrac{\chi_2 - \chi'}{\chi'} + 1} \right]$$

$$(\chi_1 - \chi')_{obs.} = \chi_1 - \quad \chi_1 - \left[\chi_1 + (\chi_2 - \chi_1) - (\chi_2 - \chi') \right],$$

on obtient :

$$\frac{(\chi_1 - \chi')_{calc.}}{(\chi_1 - \chi')_{obs.}} = 0{,}724 \text{ avec } C_1 = 1 \text{ g. / 100 ml.}$$

ce qui signifie que l'incrément de conductivité mesuré au niveau d'une frontière ascendante est plus important que celui prévu par la théorie. Dans le cas de plusieurs frontières ce calcul n'est applicable qu'à la plus rapide (voir § II. A. 1. a. 2°).

b) *Enregistrement simultané des gradients conductimétriques et réfractométriques dans les 2 branches.*

Les enregistrements reproduits sur les figures 35 et 36 ont été obtenus au moyen du dispositif conductimétrique antérieurement décrit [87]. La superposition des diagrammes réfractométriques et conductimétriques est réalisée grâce à la position parfaitement définie du repère commun X_1 qui représente une abcisse arbitraire par rapport aux électrodes de mesure.

L'enregistrement de la branche ascendante reproduit sur la figure 35 a été réalisé après 21 h. environ d'électrophorèse (compensation automatique [85]) afin d'obtenir une individualisation totale des pics *3* et *4*.

L'enregistrement de la branche descendante (fig. 36) a par contre été effectué dès la cinquième heure d'électrophorèse.

Cette durée a été imposée par les faits suivants : l'anomalie ζ apparente dès les premières minutes de l'électrophorèse s'individualise plus nettement par la suite. Mais au delà de la cinquième heure, la compensation nécessaire au maintien des frontières mobiles dans la zone optique a pour effet de refouler le gradient ζ dans la branche descendante. Or, on sait que la stabilité des veines liquides verticales contenues dans les deux branches résulte de la superposition dans celles-ci de milieux de densité croissante de haut en bas (tampon, solution « ajustée », solution protéique). La

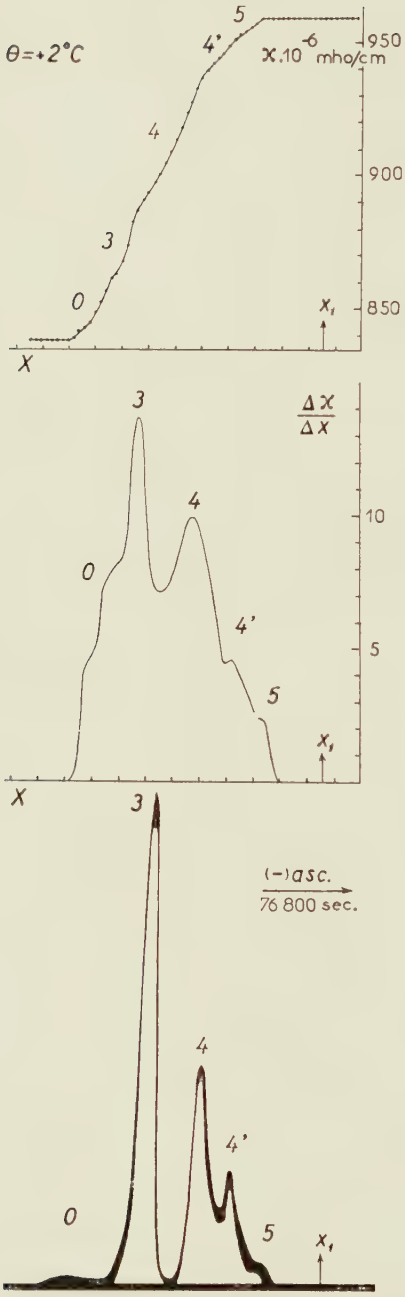


FIGURE 35. — Diagramme des conductivités enregistrées au niveau des frontières ascendantes de COHb A (caco. —, Cl—; I = 0,0175, pH = 6,5) et son expression différentielle, comparées au diagramme réfractométrique différentiel

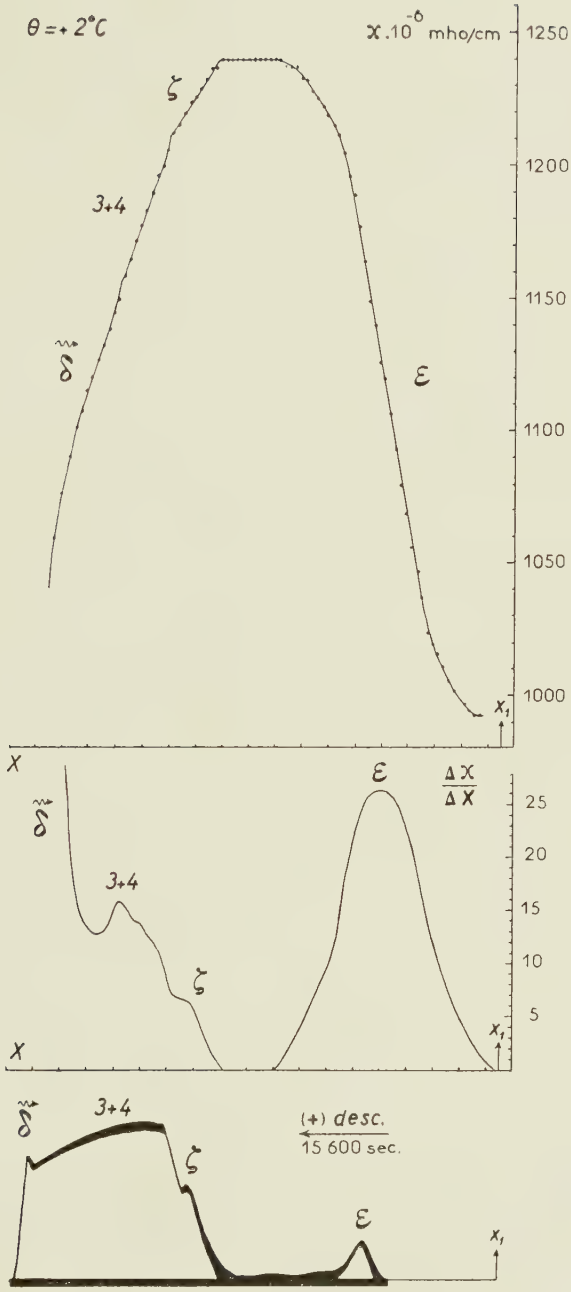


FIGURE 36. — Diagramme des conductivités enregistrées au niveau des frontières descendantes de COHb A (caco.—, Cl—; I = 0,0175; pH = 6,5) et son expression différentielle, comparées au diagramme réfractométrique différentiel

compensation, en refoulant dans le bas de la branche descendante un milieu de densité plus faible que celui qui le surmonte, rompt l'équilibre de la veine liquide et détermine une perturbation s'étendant progressivement à la totalité du diagramme descendant. Aux environs de la cinquième heure, le front ($\hat{z}$) de cette perturbation n'en affecte encore que la partie antérieure (fig. 36).

L'examen des figures 35 et 36 conduit aux constatations suivantes :

1° Les gradients conductimétriques et réfractométriques sont exactement superposables ;

2° Leur valeur respective précise la prédominance de la variation de concentration saline ou protéique en fonction de X (abcisse de la cellule à électrophorèse). Le gradient salin est plus accusé que le gradient protéique au niveau des frontières *4*, *4'*, *5* et *z*.

B. — Etude des gradients réfractométriques.

Les gradients réfractométriques observés en cours d'électrophorèse de carboxyhémoglobine d'adulte ont été étudiés en fonction des 4 paramètres déjà envisagés dans le paragraphe A : nature des anions, force ionique, pH et concentration protéique.

1) *Influence de l'anion tampon à concentration protéique* $C_1 = Cte$.

Les tampons de force ionique et de pH voisins utilisés pour l'électrophorèse de COHb A sont de même nature que ceux dont l'influence sur $(\Delta z)_0$ a été étudiée dans le paragraphe précédent et leurs caractéristiques sont fournies par le tableau XXI, dans l'ordre des valences croissantes des anions.

TABLEAU XXI

ANION	I	pH 20° C	U (10^{-5})
Cl^- (1)	0,0175	6,5	+ 5,9
Caco $^-$, Cl^-	0,0175	6,5	+ 5,0
Cacodylique (2)	0,01875	6,6	+ 3,8
Mono $^-$ et diphos.	0,012	6,5	+ 3,3
Citrique	0,0175	6,6	+ 1,4

(1) La protéine est le seul tampon présent.

(2) Tampon de Michaelis [74].

Au pH (inférieur à l'isoélectrique de la protéine) et à la force ionique adoptés, les faits observés sont les suivants :

1° Les frontières ascendantes sont stables en présence d'anions du tampon monovalents.

2° En présence d'anions polyvalents, on constate dans la branche ascendante, une instabilité qui se traduit par une frontière unique infiniment aiguë, au-dessous de laquelle des stries faiblement réfringentes apparaissent dans la veine liquide protéique.

3° Dans les deux cas, la vélocité des frontières demeure parfaitement constante au cours d'électrophorèses de 24 h. dans un champ électrique de l'ordre de 7 volts/cm. La mobilité de l'ion protéique calculée à partir de la conductivité $\varkappa_1$ du tampon croît en raison inverse de la valence de l'anion (tableau XXI).

4° L'anomalie ζ affectant la partie postérieure de la frontière descendante n'est observée qu'en présence d'anions monovalents.

2) *Influence du pH.*

Cette influence sur le comportement électrophorétique de la carboxyhémoglobine en milieux de faible force ionique a été étudiée aux pH suivants : pH = 4,7 (tampon acéto-acétique, I = 0,0175), pH = 5,0 — 9,6 (mélange acide cacodylique-cacodylate-chlorure-soude, I = 0,0175), pH = 8,2 (tampon diphosphorique, I = 0,03 [15]), pH = 9,0 (tampon diéthylbarbiturique, I = 0,02).

Les résultats expérimentaux obtenus dans ces divers milieux étant univoques, nous nous bornerons à présenter, à titre d'exemple, quelques-uns des diagrammes enregistrés en mélange cacodylique de force ionique = 0,0175 et de divers pH (fig. 37), l'ensemble de ceux-ci ayant par ailleurs permis d'étudier l'influence du pH sur la mobilité de COHb A (fig. 38).

La figure 38 démontre que le pH isoélectrique de COHb A est égal à 7,51 à force ionique I = 0,0175, et que la courbe représentative de la fonction $U_{COHb\ A} = f(pH)$ présente un net changement de pente de part et d'autre de cette valeur.

L'examen des diagrammes met en évidence les faits suivants :

1° Dans la branche négative ($pH = pH_i$), frontière protéique unique et stationnaire conservant sa forme initiale en s'affinant.

2° Dans la branche positive ($pH = pH_i$), étalement du gradient protéique selon la distribution régulière de Gauss. Présence de l'anomalie ζ au sommet.

3° Dans la branche positive (descendante à $pH < pH_i$ et ascendante à $pH > pH_i$) l'anomalie ζ, très importante aux pH de l'ordre de 5 s'atténue progressivement en milieux de pH croissant et s'annule au-dessus de l'isoélectrique. Une instabilité de frontière

est liée à la présence de l'anomalie dans la branche descendante et se manifeste d'autant plus rapidement que cette anomalie est plus importante.

4° Dans la branche négative ascendante (pH < pH_i), l'anomalie ζ se manifeste au niveau du pic 4 avec une intensité inversement proportionnelle au pH : aux pH voisins de 5, elle entrave totalement la diffusion de cette frontière qui s'enregistre sous forme d'un pic infiniment aigu ; cet effet s'atténue lorsque le pH s'élève et la proportion apparente du pic 4 décroît.

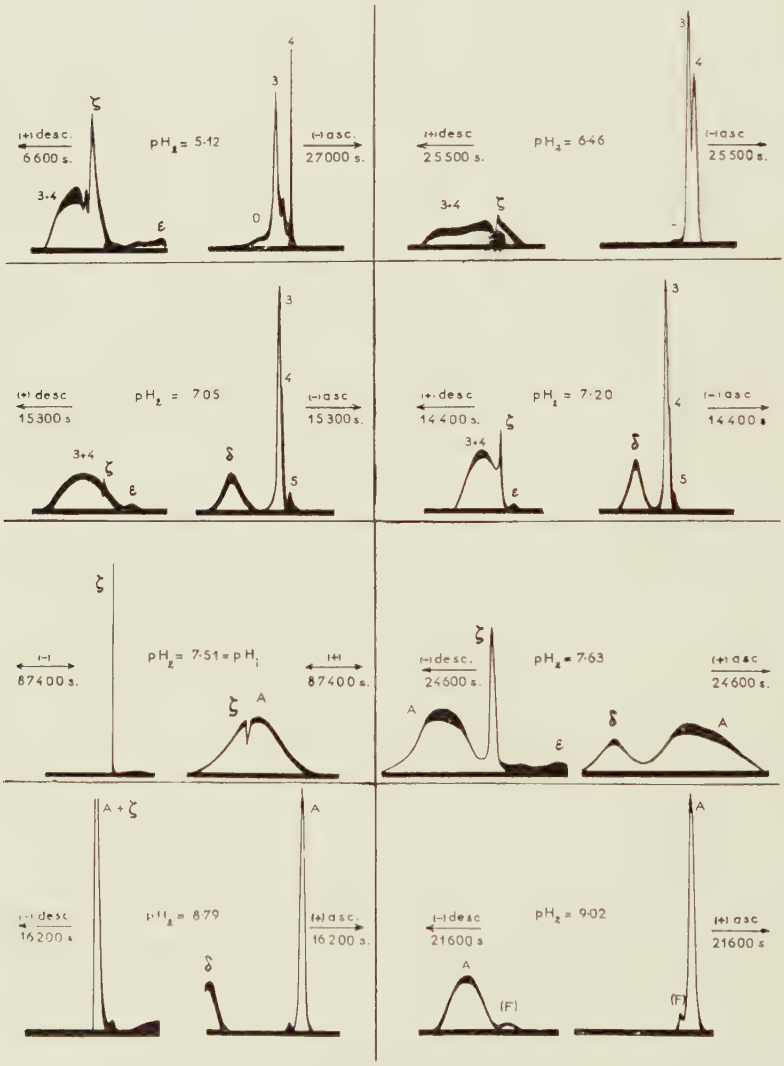


FIGURE 37. — Diagramme d'électrophorèse de COHb A (C_1 = 1 p. 100 ml.) dans caco. —, Cl— ; I = 0,0175), en fonction du pH mesuré à + 20° C

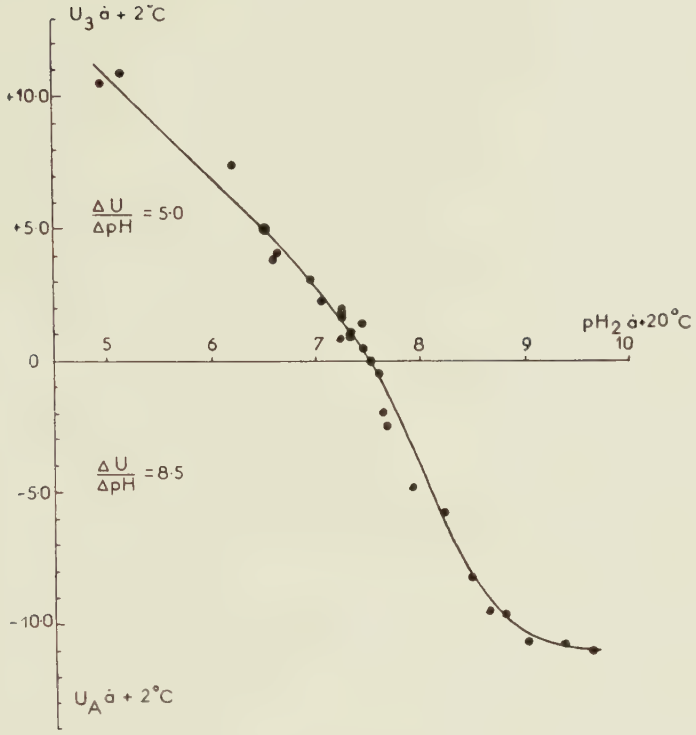


FIGURE 38. — Détermination du pH_i de COHb A (C_1 = 1 g. p. 100 ml.) par électrophorèse en tampon caco.—, Cl—; I = 0,0175. La mobilité U est exprimée en 10^{-5}. cm^2. $volt^{-1}$. $sec.^{-1}$. L'incrément ΔU est exprimé en 10^{-5}. cm^2. $volt^{-1}$. $sec.^{-1}$

3° Dans la branche négative descendante ($pH > pH_i$), l'anomalie ζ se manifeste avec une intensité maximum aux pH légèrement supérieurs à l'isoélectrique et l'on observe, entre sa grandeur et l'instabilité de la frontière, une relation analogue à celle signalée dans le cas de la branche positive descendante.

L'élévation du pH a pour effet de rapprocher l'anomalie ζ de la frontière mobile, puis de l'accoler à la partie postérieure de celle-ci dont elle entrave alors la diffusion en demeurant stable. Elle disparaît enfin aux pH compris entre 9 et 10 auxquels les diagrammes enregistrés dans les deux branches sont symétriques (diffusion normale des frontières).

Par ailleurs, la valence de l'anion protéique, dont l'influence à $pH < pH_i$ a été précédemment démontrée, ne paraît plus intervenir à $pH > pH_i$. En effet, les diagrammes ascendants enregistrés au cours d'électrophorèses effectuées en milieu cacodylique et en tampon diphosphorique sont pratiquement identiques.

3) *Influence de la force ionique à pH et C_t constants.*

Le tampon cacodylique utilisé à été défini au § A. 1. a.

Nous étudierons l'influence de la force ionique, d'une part, sur la mobilité de la carboxyhémoglobine et, d'autre part, sur le gradient $(\frac{dn}{dx})_M$.

a) *Force ionique et mobilité :* La relation unissant la force ionique à la mobilité observée U de l'hémoglobine est représentée par l'équation (7) de Davis et Cohn [26] déduite de la théorie d'Onsager :

$$U = U_0 - A' (\sqrt{I} - I)$$

équation dans laquelle :

U = mobilité observée à la force ionique I

U_0 = mobilité à force ionique nulle

A'/U_0 = constante indépendante de la nature du tampon égale à 3,15 (moyenne calculée à partir du tableau V, p. 2098 [26]).

En posant :

$$A' \text{ moy.} = [U/0{,}317 - (\sqrt{I} - I)] \text{ moy.}$$

on obtient la valeur de U_0 :

$$U_0 = U + A' \text{ moy.} (\sqrt{I} - I)$$

Il ressort de l'examen des résultats expérimentaux consignés dans le tableau XXII que l'équation de Davis et Cohn se vérifie lorsque :

$$U_0 = + 7{,}87 \text{ avec } I > 0{,}00875$$
$$U_0 = + 8{,}86 \text{ avec } I < 0{,}00875$$

Ces deux valeurs de U_0 ont été respectivement désignées par $(U_{PA})_0$ et $(U_{P})_0$ sur la figure 39 qui illustre l'influence expérimentale de la force ionique sur la mobilité de la frontière principale de COHb A dans la branche ascendante (courbe en trait plein) et sur laquelle ont été également reportées les valeurs des mobilités idéale $(U)_i$ et théorique $(U)_t$ du chromoprotéide en milieu cacodylique de force ionique = 0,0175 et de pH = 6,5.

La valeur approchée de la mobilité idéale $(U)_i = 8{,}15 \cdot 10^5$ a été calculée indifféremment à partir de la relation d'Adair [4] :

$$(U_P)_0 = \frac{z\,p.\ 4{,}774 \cdot 10^{-10}}{3 \cdot 10^2\ 6\pi\eta r}$$

ou celle de Tiselius et Svensson [109] :

$$(U_P)_0 = (U)_i = \frac{F.\ z\,p.\ 3 \cdot 10^9}{f \cdot 3 \cdot 10^2}$$

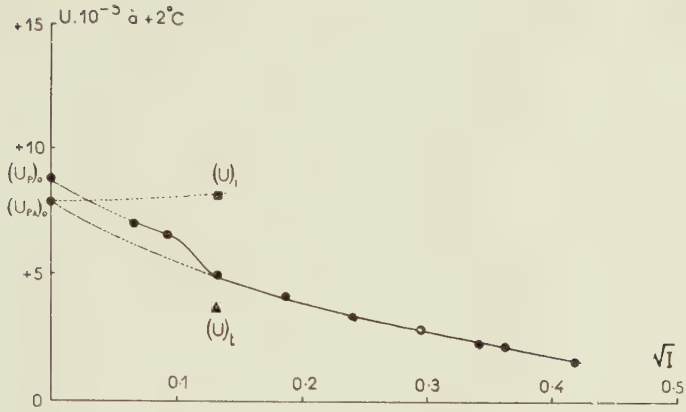


FIGURE 39. — Mobilité U de la frontière 3 de COHb A (C_1 = 1 g. p. 100 ml.) observée en fonction de la force ionique I du tampon caco.—, Cl— à pH = 6,55. $(U_p)_0$ = mobilité de la protéine libre P extrapolée à I = 0 ; $(U_{PA})_0$ = mobilité du complexe PA extrapolée à I = 0 ; $(U)_i$ = mobilité idéale du complexe PA ; $(U)_t$ = mobilité théorique du complexe PA

TABLEAU XXII

I	$\sqrt{I}$	$\frac{I}{0,317 - \sqrt{I}}$	U (10^{-5})	A′ (10^{-5})	A′ moy. (10^{-5})	A′ moy. $\sqrt{I}$-I (10^{-5})	Uo (10^{-5})	Uo moy. (10^{-5})
0,175	0,4183	13,57	1,63	22,12		6,022	7,65	
0,13125	0,3623	11,63	2,13	24,77		5,720	7,85	
0,11666	0,3415	10,85	2,28	24,74		5,56	7,84	
0,08750	0,2958	9,20	2,88	26,50	24,75	5,16	8,04	7,87
0,0583	0,2415	7,47	3,29	24,58		4,53	7,82	
0,035	0,1870	6,06	4,13	25,03		3,76	7,89	
0,01750	0,1323	4,95	5,15	25,49		2,84	7,99	
0,00875	0,0935	4,31	6,57	28,32	27,98	2,37	8,94	8,96
0,0044	0,0664	3,92	7,05	27,64		1,74	8,79	

En effet, d'après la loi de STOKES, la vitesse d'un ion sphérique de rayon r dans une solution de dilution infinie est égale à :

$$(U_p)_0 = QX / 6 \pi \eta r$$

exprimée en unité électrostatiques, où Q = charge, X = l'intensité de champ et η la viscosité.

En posant :

N = cte d'AVOGADRO

D = cte de diffusion

f = coefficient de friction moléculaire

R = constante des gaz parfaits

on a pour des solutions diluées :

$f = RT/D$ et $D = RT/6 \pi \eta N r$

d'où :

$f = 6 \pi \eta N r$

D'après la loi de FARADAY, la charge de l'électron est égale à :

$$e = \frac{3 . 10^9 . F}{N} = 4{,}774 . 10^{-10} \text{ en unités électrostatiques c. g. s.}$$

$Q = e . z_p = 4{,}774 . 10^{-10} . z_p$

si $X = 1$ volt/cm. = 1/299,78 unités électrostatiques c. g. s. $\simeq 1/3{,}0 . 10^2$,

on obtient la relation précédente d'ADAIR.

En posant :

$\eta = 0{,}01717$ poise à + 2° C pour l'eau,

$r = 30{,}9 . 10^{-8}$ pour la molécule de ferrohémoglobine,

on obtient la relation de TISELIUS-SVENSSON.

En présence d'ions diffusibles, cette mobilité $(U_p)_o$ est réduite à la valeur (U_t) (mobilité théorique) selon la théorie de DEBYE et HUCKEL. La relation unissant ces deux valeurs est donnée par ADAIR [4] :

$$(U_t) = (U_p)_o \, (d/d + r) \, [\Phi \, Kr] \, \eta_o/n_s$$

Explicitons et calculons cette équation pour l'ion hémoglobinique :

DEBYE et HUCKEL assimilent la particule protéique à un condensateur formé par deux armatures sphériques concentriques de rayon r et r + d. La différence de potentiel entre ces deux sphères est appellé ζ — potentiel :

$$\zeta \text{ — pot.} = (Q/Er) \, (d/r + d)$$

où : E = constante diélectrique

$d = 1/K$ (K = longueur réciproque)

à + 0,5° C $\simeq$ + 2° C, $K = 0{,}325 \, I^{1/2} . 10^8$ [4]

Avec $I = 0{,}0175$, $K = 0{,}325 . 0{,}1323 . 10^8 = 0{,}043 . 10^8$

$d = 23{,}3 . 10^{-8}$; $r + d = (30{,}9 + 23{,}3) \, 10^{-8} = 54{,}2 \, 10^{-8}$

Si η_o/η_s = viscosité de la solution rapportée à celle de l'eau $\simeq 1{,}0$

$d/d + r = 0{,}43$

ΦKr = fonction calculée par HENRY (cf. [76])

Kr 1,33, ΦKr 1,03

On obtient finalement :

$(U)_t = (U_p)_o . 0{,}443 = 3{,}61 . 10^{-5} . cm^2 . volt^{-1} . sec.^{-1}$.

La figure 39 met en évidence les faits suivants :

1° Conformément à la théorie, la mobilité observée croît en raison inverse de la force ionique.

2° La courbe représentative de cette variation présente cependant la particularité de passer, en dessous de $\sqrt{I} = 0{,}1$, par des valeurs de 13 p. 100 supérieures à celles déduites par extrapolation des données expérimentales obtenues aux forces ioniques plus élevées. Cette discontinuité traduit le fait, signalé plus haut, selon lequel l'équation de Davis et Cohn ne peut rendre compte de la fonction expérimentale : $U = f(I)$, qu'à la condition d'attribuer à U_0 une valeur différente de part et d'autre de $I = 0{,}00875$.

3° A une force ionique déterminée, la mobilité observée est plus grande que la mobilité théorique (fait déjà établi par Adair [4] pour la COHb de Mouton).

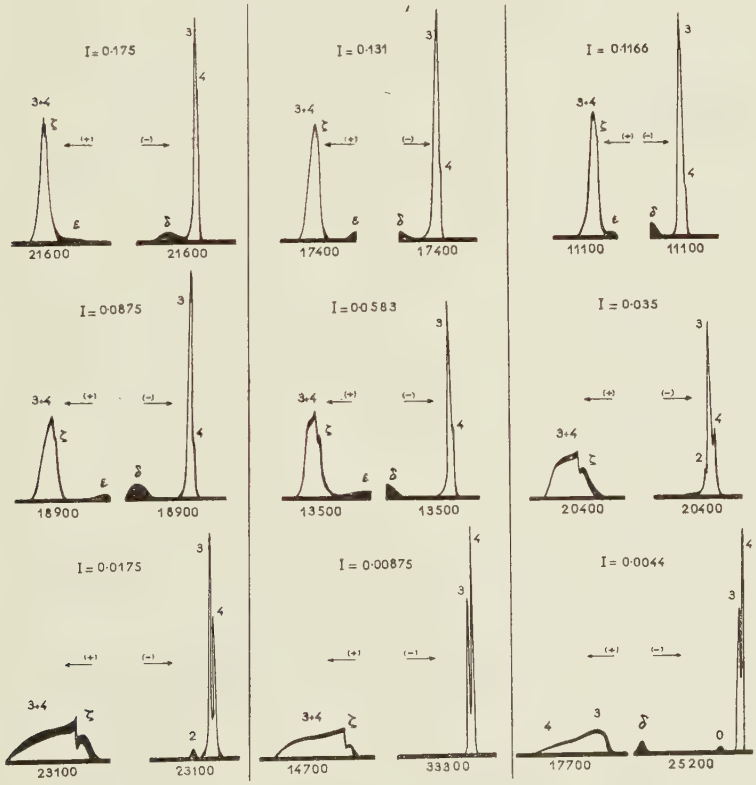


Figure 40. — Diagramme d'électrophorèse de COHb A ($C_1 = 1$ g. p. 100 ml.) en fonction de la force ionique I du tampon caco—, Cl—; pH = 6,5. $\theta = +2°$ C.

b) *Force ionique et gradient* $(\frac{dn}{dx})_M$

On peut observer sur la figure 40 la modification des diagrammes en fonction de la force ionique.

On constate que l'abaissement de cette dernière, de I = 0,175 à I = 0,0044, a les effets suivants :

1° Amélioration de la résolution des frontières *3* et *4* de la carboxyhémoglobine, en accord avec la théorie de DEBYE et HUCKEL.

2° Augmentation des anomalies. Dans la branche ascendante, retard à la diffusion et augmentation du pic *4* aux forces ioniques inférieures à I = 0,035. Dans la branche descendante, accroissement de la discontinuité ζ jusqu'à I = 0,0175 ; puis diminution et disparition de l'anomalie à I = 0,0044.

4) *Influence de C_1 à pH = 6,5 et I = 0,0175.*

En accord avec les données de HOCH [42], les résultats expérimentaux rassemblés dans le tableau XXIII démontrent que la mobilité moyenne de la frontière principale *3* de COHb A augmente avec la concentration C_1 du chromoprotéide.

L'influence de C_1 sur les gradients réfractométriques est mise en évidence par la figure 41. On constate notamment que dans la branche descendante l'anomalie ζ diminue lorsque C_1 s'élève et devient nulle ou négligeable à partir de C_1 = 1,48 g. 100 ml., alors que dans la branche ascendante les gradients réfractométriques atteignent des valeurs incompatibles avec leur enregistrement total.

II. — Interprétation

Les recherches dont les résultats viennent d'être exposés mettent en évidence des divergences systématiques entre les données expérimentales et les valeurs calculées sur les bases théoriques développées par SVENSSON [106]. Mais il importe de rappeler que ces dernières ont été établies en admettant que les électrolytes mis en jeu sont totalement dissociés et, de ce fait, ne participent à aucune réaction secondaire. Or, les électrolytes faibles que sont les protéines participent à de telles réactions avec les ions du tampon [107, 22, 10, 6]. Cependant, cette interaction est pratiquement sans effet — et la théorie demeure applicable — dans le cas des électrophorèses opérées en solutions bien tamponnées (conditions classiques) réduisant au minimum les gradients de pH [67] [107].

Nous nous proposons d'établir que les interactions : protéine — anions sont responsables des divergences que nous avons observées en faisant varier les conditions expérimentales de la dialyse et de l'électrophorèse et de préciser le mécanisme par lequel elles induisent l'anomalie ζ en milieux de faible force ionique, lesquels sont pratiquement dépourvus de pouvoir tampon.

TABLEAU XXIII

C_1 (g/100 ml.)	U_{moy} 10^{-5}
0,51	4,99
0,66	5,08
0,86	5,21
1,12	5,37
1,48	5,60
1,71	5,74

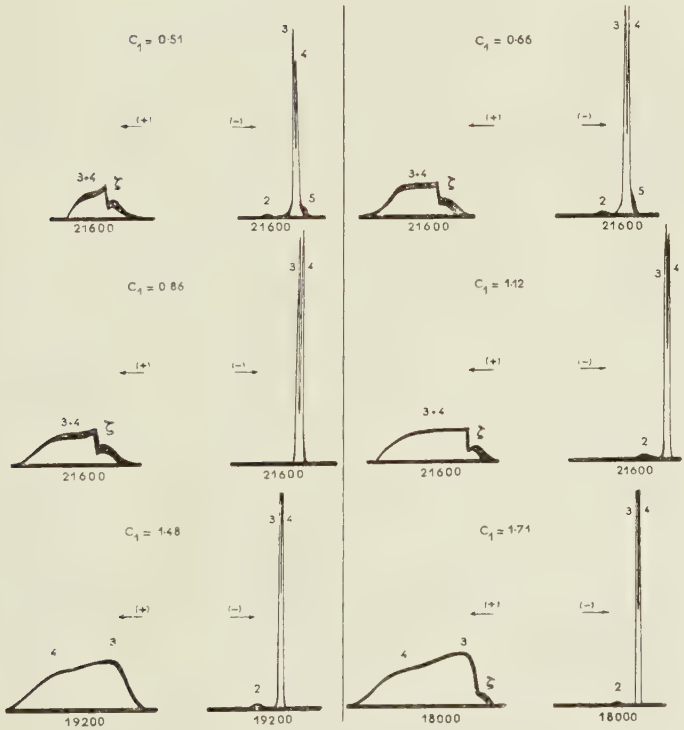


FIGURE 41. — Diagramme d'électrophorèse en fonction de la concentration C_1 (exprimée en g. p. 100 ml.) de COHb A, caco.—, Cl—; I = 0,0175; pH = 6.5. A gauche, b. descendante; à droite b. ascendante. La durée de l'électrophorèse est exprimée en secondes

L'aptitude de la sérumalbumine et de l'hémoglobine à fixer préférentiellement les anions a fait l'objet d'un important ensemble de recherches. Sa démonstration expérimentale repose sur des mesures de pression osmotique [93] et de potentiel de membrane [95, 96], sur l'étude de la répartition des ions de part et d'autre de la membrane (méthode dite de distribution) [95, 96, 19], sur l'étude de la variation des pH isoélectrique [3, 68, 111] et isoionique [94], sur l'étude de la translation des courbes de titration [103], sur l'étude des propriétés qu'ont les anions du tampon de déplacer des anions colorés de leurs complexes avec les protéines [56] et sur les données fournies par l'électrophorèse opérée dans les conditions particulières adoptées par ALBERTY [8, 9].

L'interaction d'une protéine (P) avec les ions (A) a été définie par LONGSWORTH et MAC INNES [71] sous forme de la réaction générale d'équilibre suivante :

$$P + \nu A \underset{k_2}{\overset{k_1}{\rightleftharpoons}} PA_\nu \qquad (5)$$

dans laquelle les constantes k_1 et k_2 ont des valeurs voisines et élevées, ν représentant le nombre d'ions monovalents participant à la combinaison.

Les conséquences théoriques de telles interactions, dans le cas des combinaisons entre la protéine (P) et les anions (A) du tampon, peuvent être résumées comme suit :

1° Diminution mesurable de l'activité de l'anion A^- dans la solution protéique [1, 2, 3].

2° Diminution de la conductivité χ_1 de la solution saline lorsque la solution protéique est dialysée contre un volume réduit de celle-ci (méthode de distribution [95]), ou de la conductivité χ_2 de la solution protéique dialysée contre un volume infini de solution saline (χ_1 = cte).

3° Diminution de la charge positive de la protéine P par combinaison de ν groupements basiques de celle-ci avec ν anions A^- monovalents. Cette combinaison stoechiométrique résulte d'une interaction électrostatique [91] et n'affecte que certains groupements de la protéine [103, 82, 83, 81, 38]. Elle se traduit par une modification de la mobilité de l'ion protéique [39, 109, 14] telle que :

$$|U_{PA}| > |U_P|, \text{ si } pH > pH_i$$

$$|U_{PA}| < |U_P|, \text{ si } pH < pH_i$$

4° Fixation de protons (diminution du nombre de groupements carboxyliques dissociés de la protéine) concomitante à la fixation d'anions, d'où élévation du point isoionique par addition de sel neutre à la solution protéique [68, 94].

Sur ces bases, il est possible de rattacher aux interactions : $P + \nu A \rightleftarrows PA_\nu$, à la fois les dérogations des équilibres dialytiques aux lois idéales les régissant et les perturbations siègeant au niveau des frontières mobiles, ces perturbations résultant de l'évolution des mêmes phénomènes sous l'influence du courant électrique.

Les recherches que nous avons exposées peuvent se ramener à l'étude de l'influence des trois paramètres suivants sur l'équilibre dialytique et sur le comportement électrophorétique de la carboxyhémoglobine.

1° Etat électrique de P (dépendant du pH).

2° Proportions relatives des ions A^- et P^+ mis en présence (dépendant de I et de C_1).

3° Valence de l'anion du tampon.

A. — Etat électrique de P.

Nous avons établi qu'en tampon à base de sels monomonovalents, la différence entre les valeurs observées et calculées de $(\Delta\varkappa)_D$, d'une part, et les anomalies ζ et ζ', d'autre part, diminuent lorsque le pH s'élève, pour s'annuler à pH = 8,6. Or, il a été établi, dans le cas de l'hémoglobine [98] qu'à ce pH les groupements imidazoles de l'histidine ne sont plus dissociés (pH $\geqslant$ 8,5), et que les groupements aminés ne le sont que très faiblement (dissociation nulle à pH $\geqslant$ 9,0). Il apparaît ainsi que les perturbations constatées au cours de la dialyse et l'anomalie ζ de l'électrophorèse sont proportionnelles au nombre de charges positives portées par l'ion protéique. L'affinité de ce dernier pour les anions augmentant avec sa charge positive, on est conduit à admettre que la formation de combinaisons PA_ν est responsable des phénomènes observés.

— En ce qui concerne les équilibres dialytiques, cette déduction est en accord avec les conclusions de Scatchard [95] qui a démontré, par des mesures de conductivité et de potentiel de membrane, que lors de la dialyse d'une solution protéique contre un faible volume de solution saline, la fixation d'une partie des anions sur la protéine modifie leur répartition théorique globale. Seuls les ions demeurant libres se répartissent entre les deux milieux conformément à la théorie. La formation de la combinaison PA_ν dans la solution protéique a pour effet d'abaisser la conductivité $\varkappa_1$ de la solution saline. Dans les conditions expérimentales que nous avons adoptées : volume de solution tampon 100 fois supérieur à celui de la solution protéique, l'abaissement

de $\varkappa_1$ ne doit plus être observable ($\varkappa_1$ = cte) et l'effet décrit par SCATCHARD ne doit affecter que la valeur de $\varkappa_2$. C'est ce que vérifient nos résultats expérimentaux.

— L'évolution de la combinaison PA_ν en cours d'électrophorèse peut être schématisée comme suit :

Avant le passage du courant électrique, la répartition des ions *libres* de part et d'autres des interfaces : solution protéique solution tampon, dans les deux branches de la cellule a été réglée par la loi de DONNAN au cours de la dialyse précédant l'électrophorèse ; de plus, la solution (2) renferme une certaine quantité de combinaison PA_ν qui est responsable du fait que l'équilibre *global* diffère de celui prévu par la théorie.

L'établissement d'un champ électrique peut modifier le degré de cette combinaison et sa répartition dans la solution protéique. La mobilité des anions A^- étant toujours supérieure en valeur absolue à celle des ions protéiques, leur transport électrique a pour effet de modifier le degré ν de la combinaison PA_ν en faisant varier la probabilité de rencontre entre A^- et PA_ν mis en présence par unité de temps dans une même couche de la veine liquide. Le flux constant d'anions traversant la veine protéique depuis l'interface (1/2) de la branche négative va donc faire évoluer la combinaison PA_ν vers un degré supérieur $\nu + 1$. Mais, *au niveau même des interfaces* (fig. 42), les anions A^- modifient leur vitesse de migration pour conserver un débit constant à tous les niveaux de la cuve à électrophorèse, indépendamment de leur répartition entre (2) et (1) (équation (2)). Il est donc logique de s'attendre à ce que l'évolution de la combinaison $PA_{\nu+1}$ présente les particularités suivante [2] :

1° A l'interface de la branche négative (pénétration d'anions), élévation du degré de combinaison à la valeur $\nu + 2$, liée à l'accélération γ de la vélocité de A^-. Formation de $PA_{\nu+2}$ stable lorsque $[A^-]/[PA_{\nu+1}^+] \geqslant 1$.

2° A l'interface de la branche positive (sortie d'anions), abaissement du degré de combinaison à la valeur ν, lié au ralentissement $-\gamma$ de la vélocité de A^-. Formation de PA_ν stable lorsque $[A^-]/[PA_{\nu+1}^+] \geqslant 1$.

(2) La localisation des phénomènes perturbateurs aux interfaces est justifiée par l'absence de perturbations au niveau des frontières stationnaires δ et ε (§ I A. 2).

Ces quatre types de réaction correspondent à un déplacement vers la droite des équilibres schématisés comme suit à partir de l'équation (5) de LONGSWORTH :

$$\text{Dialyse}\begin{cases} pH < pH_i & {}^{-}P^{+3} + \nu A^{-} \rightleftarrows {}^{-}PA_{\nu}^{+(3-\nu)} & (6) \\ pH > pH_i & {}^{-2}P^{+} + \nu A^{-} \rightleftarrows {}^{-(\nu+2)}PA_{\nu}^{+} & (6') \end{cases}$$

$$\text{Sol. Protéique (2)}\begin{cases} pH < pH_i & {}^{-}PA_{\nu}^{+(3-\nu)} + A^{-} \rightleftarrows {}^{-}PA_{\nu+1}^{+(2-\nu)} & (7) \\ pH > pH_i & {}^{-(\nu+2)}PA_{\nu}^{+} + A^{-} \rightleftarrows {}^{-(\nu+3)}PA_{\nu+1}^{+} & (7') \end{cases}$$

$$\text{Interface (1/2) b. negative}\begin{cases} pH < pH_i & {}^{-}PA_{\nu+1}^{+(2-\nu)} + A^{-} \rightleftarrows {}^{-}PA_{\nu+2}^{+(1-\nu)} & (8) \\ pH > pH_i & {}^{-(\nu+3)}PA_{\nu+1}^{+} + A^{-} \rightleftarrows {}^{-(\nu+4)}PA_{\nu+2}^{+} & (8') \end{cases}$$

$$\text{Interface (1/2) b. positive}\begin{cases} pH < pH_i & {}^{-}PA_{\nu+1}^{+(2-\nu)} \rightleftarrows {}^{-}PA_{\nu}^{+(3-\nu)} + A^{-} & (9) \\ pH > pH_i & {}^{-(\nu+3)}PA_{\nu+1}^{+} \rightleftarrows {}^{-(\nu+2)}PA_{\nu}^{+} + A^{-} & (9') \end{cases}$$

Il est possible de concevoir, à partir d'un tel schéma, le déterminisme de l'anomalie ζ. Nous proposons de le préciser dans le cas des données expérimentales fournies par l'électrophorèse de la carboxyhémoglobine d'adulte en milieux ne renfermant que des sels mono-monovalents, de force ionique $\simeq$ 0,0175 et de $pH_{(1)}$ éloignés ou voisins de 7,5 (pH isoélectrique, à la force ionique considérée, des deux constituants électrophorétiques *3* et *4* d'Hb A). Dans l'exposé suivant, $P_{(3)}$, $P_{(4)}$, $pH_{(1)}$ et $pH_{(2)}$ désignent respectivement les constituants *3* et *4* de l'hémoglobine d'adulte, le pH de la solution tampon et celui de la solution protéique.

1) *pH < 7.*

a) *Branche ascendante négative.*

La différence absolue des mobilités des anions A^- et des cations P^+ (tableaux XVI, XXI, XXII et XXIII, figure 38), d'une part, le nombre de charges positives portées par l'ion protéique, d'autre part, s'accroissent lorsque le pH s'abaisse en dessous de l'isoélectrique. Ces deux ordres de fait concourent à augmenter la probabilité de combinaison entre ces ions et, au cours de l'électrophorèse, cette probabilité demeure la plus grande au niveau de la surface de pénétration des anions.

Au temps zéro, le gradient protéique subit toujours un certain étalement sous l'influence conjuguée de la convection thermique, de frottements mécaniques (ouverture des cellules, compensation) et de la diffusion. Aussi, au début de l'électrophorèse existe-t-il

nécessairement à l'interface : tampon/protéine, une couche superficielle de très faible teneur en combinaison $PA_{\nu+1}$ telle que $[A^-] / [PA_{\nu+1}^+] \geqslant 1$. L'augmentation de la quantité efficace $\gamma\ [A^-]$, par unité de temps, sous l'effet de l'accélération γ déjà décrite, aboutit à la formation de la combinaison stable $PA_{\nu+2}$ (équation (8)). La limite inférieure ζ' de cette couche correspond à l'ajustement de la concentration équivalente de $[PA_{\nu+1}^+]$ à la concentration équivalente efficace de $\gamma\ [A^-]$; $PA_{\nu+2}$ s'individualise sur les diagrammes (fig. 27) sous la forme du pic 5 qui diffuse normalement, sa quantité étant maintenue constante par la

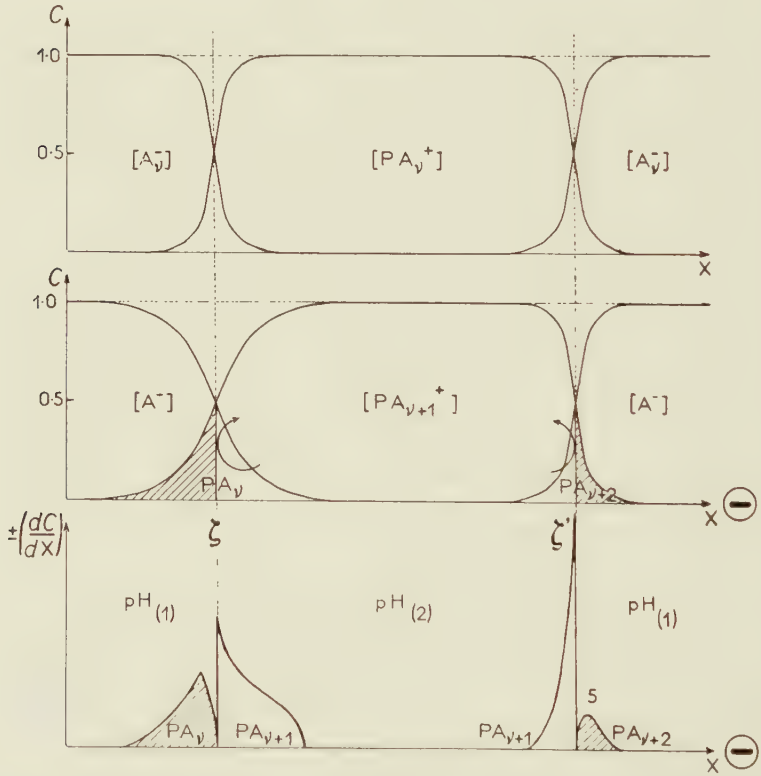


FIGURE 42. — *En haut :* concentration équivalente et répartition dans la veine liquide au temps zéro des anions A— et du complexe PA_ν formé après dialyse.

Au centre : concentration efficace des anions et concentration des complexes PA_ν, $PA_{\nu+1}$, $PA_{\nu+2}$ formés en cours d'électrophorèse. Leur répartition est indiquée en fonction de leur position cathodique x.

En bas : expression différentielle $dC/dx = f(x)$ de la concentration des complexes formés.

Les zones hachurées sont celles où se forment les combinaisons PA_ν et $PA_{\nu+2}$ stables.

permanence, au cours de l'électrophorèse, des conditions qui lui ont donné naissance. Toutes choses égales d'ailleurs, sa quantité, toujours faible, dépend de l'étalement du gradient protéique initial (fig. 42). Aussi le pic *5* peut-il ne pas être décelable.

L'évolution des diagrammes, en fonction du temps, traduit par ailleurs la résolution progressive des frontières *3* et *4* correspondant respectivement à $P_{(3)}\ A_{\nu+1}$ et $P_{(4)}\ A_{\nu+1}$. Les perturbations affectant la forme de la frontière *4* peuvent être interprétées comme suit. Au contact des anions provenant du milieu (1), la combinaison $P_{(4)}\ A_{\nu+1}$ passe au degré supérieur $P_{(4)}\ A_{\nu+2}$ et, de ce fait, diminue de mobilité. $P_{(4)}\ A_{\nu+1}$ se trouvant en excès par rapport à $A^{-}{}_{(1)}$, cette réaction se poursuit indéfiniment. Il en résulte l'anomalie ζ' qui se traduit par :

1° Un aplatissement de la frontière *4* par un mécanisme analogue à celui mis en jeu par une association moléculaire reversible [102, 23]. Le signe négatif des gradients de pH ($pH_1 > pH_2$) et de conductivité, dont cette frontière est le siège, concourt également à conférer une forme aiguë à cette dernière [69, 67, 58, 59, 43].

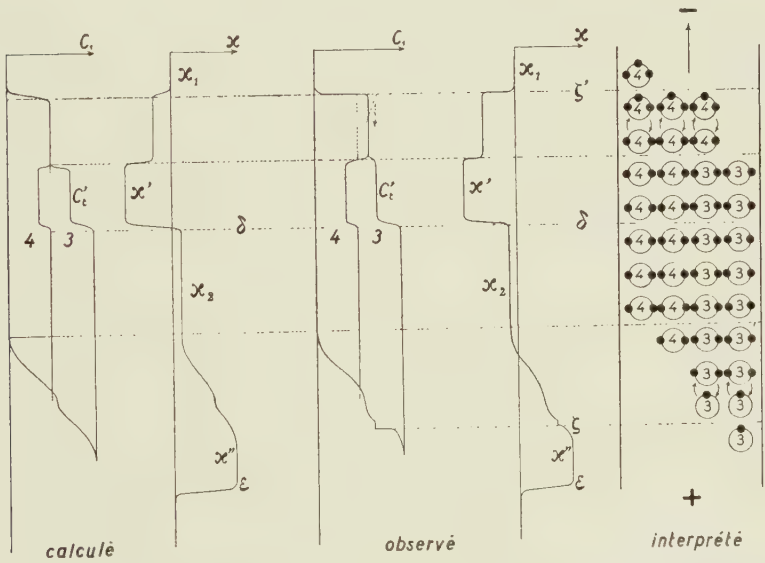


FIGURE 43. — Schéma d'ensemble des gradients de concentration protéique C_i et de conductivité :

A gauche : calculés d'après la théorie de SVENSSON [106] à $pH < pH_i$; anions monovalents.

Au centre : observés dans les mêmes conditions expérimentales.

A droite : interprétation proposée. Les cercles numérotés représentent $P_{(3)}$ et $P_{(4)}$ combinés à un, deux, trois anions ($\nu = 1$ dans le texte).

2° Un ralentissement de la mobilité de cette même frontière qui au lieu d'avoir la mobilité de $P_{(4)} A_{\nu+2}$ prend celle de $P_{(4)} A_{\nu+2}$. Il en résulte une diminution de la différence de mobilité des frontières *3* et *4* qui accroît la proportion apparente du constituant *4* conformément à la théorie classique de la superposition des gradients [106]. On est dès lors en droit d'appliquer les corrections de Hoch [42] à la détermination quantitative de ce constituant, à la seule condition que les constituants *3* et *4* soient indépendants. Les gradients superposés sont représentés sur la figure 43 qui, par ailleurs, rend compte de l'ensemble de l'interprétation proposée. Celle-ci est en accord avec le fait que l'anomalie ζ' augmente lorsque le pH s'abaisse notablement en dessous du pH, de la protéine (fig. 37).

b) *Branche descendante positive.*

Dans la couche supérieure où $[A^-] / [PA_{\nu+1}{}^+] \geqslant 1$, la diminution de la quantité efficace $-\gamma [A^-]$ par unité de temps, sous l'effet du ralentissement $-\gamma$ déjà décrit, aboutit à la libération de $[A^-]$ avec formation de PA_ν stable selon l'équation (9) (électrodialyse). La limite inférieure ζ de cette couche correspond à l'ajustement de la concentration équivalente de $[PA_\nu{}^+]$ à la concentration équivalente efficace $-\gamma [A^-]$; PA_ν s'individualise sur les diagrammes (fig. 27) sous forme d'un pic qui diffuse normalement en amont, sa quantité étant maintenue constante par la permanence, au cours de l'électrophorèse, des conditions qui lui ont donné naissance.

En dessous de la limite ζ, une partie de $PA_{\nu+1}$ se transforme en PA_ν de mobilité supérieure. Cette dernière combinaison gagne alors les couches inférieures où elle accepte de nouveau un anion en diminuant de mobilité. L'excès de $PA_{\nu+1}$ rend perpétuel ce cycle de réactions. Il en résulte l'anomalie ζ (fig. 37) qui se traduit par :

1° Une discontinuité du diagramme à la limite de séparation ζ (fig. 42) instable si la concentration de PA_ν s'accumulant contre ζ dépasse celle de $PA_{\nu+1}$ (gradient protéique négatif).

2° Une convexité de la partie antérieure du diagramme (ralentissement de PA_ν qui accepte A^- pour donner $PA_{\nu+1}$).

3° Une interpénétration des frontières respectives de $P_{(3)} A_{\nu+1}$ et $P_{(4)} A_{\nu+1}$.

En bref, les interfaces : protéine/tampon sont, dans les deux branches, le siège des réactions inverses schématisées par la figures 42. Les anomalies ζ et ζ' qui en résultent, représentent la limite de séparation de deux milieux renfermant la même fraction protéique à un degré différent de combinaison.

Les réactions secondaires déterminées par les gradients négatifs de pH (fig. 44) [3] et de conductivité (fig. 30 et 31) présents au niveau des interfaces sont responsables de la dissymétrie de l'anomalie ζ dans les deux branches. Elles ont pour effet de resserrer la frontière ascendante et d'étaler la frontière descendante, diminuant la quantité de $PA_{\nu+2}$ (fraction 5) située au-dessus de ζ' dans la première, et augmentant la quantité de PA_{ν} située au-dessus de ζ, dans la seconde. Par ailleurs, la discontinuité ζ est d'autant plus accusée que la différence absolue des mobilités des combinaisons PA_{ν} et $PA_{\nu+1}$ qu'elle sépare est plus grande et cette différence augmente avec le gradient négatif de pH dont l'anomalie est le siège.

2) $7 < pH < 7{,}5$ (pH_i).

L'élévation du pH entraînant une diminution, d'une part, de la charge positive de la protéine et, d'autre part, de la différence absolue entre la mobilité des anions A^- et celle de la protéine, il est logique de s'attendre à une manifestation moins accentuée des phénomènes précédemment décrits, notamment de ceux qui intéressent les deux interfaces. Nos résultats expérimentaux confirment la validité de cette déduction. Ils peuvent être interprétés comme suit :

a) *Branche ascendante négative :* anomalie ζ' moins directement perceptible en raison de la résolution insuffisante des pics *3* et *4* mais se manifestant cependant par l'aplatissement de la frontière et la présence du pic *5*.

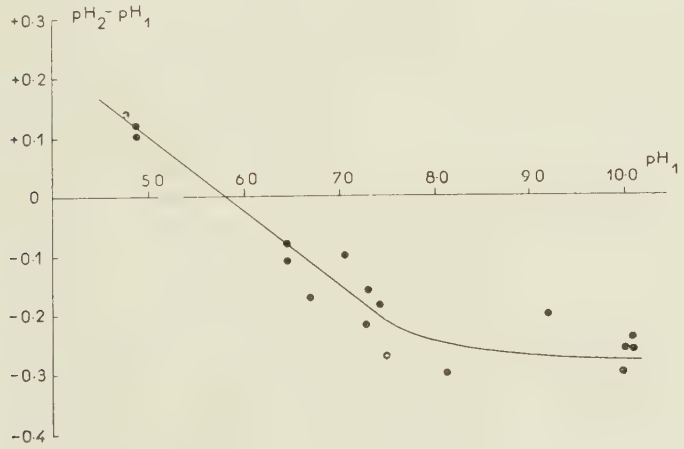


FIGURE 44. — Détermination du pH_i de COHb A ($C_1 = 1$ g. p. 100 ml.) par étude de la différence $pH_2 - pH_1$ (proportionnelle au potentiel de membrane) ; caco. —, Cl— ; I = 0,0175. $\theta = +2°C$.

(3) On notera que le gradient de pH devient positif au-dessous de pH = 5,8 [41]. Ce fait est en accord avec l'étalement de la frontière 3, dans la branche ascendante, et la diffusion contrariée des frontières, dans la branche descendante, observées à pH voisin de 5 (fig. 37).

b) *Branche descendante positive :* anomalie ζ mettant en évidence par sa position une proportion encore importante de PA_{ν}, mais très atténuée du fait d'une diffusion favorisée par le gradient de pH croissant en valeur négative lorsque le $pH_{(1)}$ s'élève (fig. 44).

3) $pH_{(2)} = 7{,}51\ (pH_i)$.

Lorsque $PA_{\nu+1}$ se trouve à l'isoélectrique ($pH_{(2)} = pH_i$), la figure 44 démontre que $pH_{(1)} > pH_i$. A l'interface de la branche négative, l'élévation du degré ν confère à la combinaison $PA_{\nu+2}$ formée une charge négative. Celle-ci est accrue par le fait que $pH_{(1)} > pH_{(2)}$. En sorte que la frontière protéique, stationnaire, conserve sa forme initiale en s'affinant davantage.

A l'interface de la branche positive, l'effet de l'abaissement du degré ν s'oppose à celui du gradient négatif de pH. La présence de l'anomalie ζ au niveau de l'ordonnée centroïde du gradient protéique diffusant normalement (courbe de Gauss) traduit une légère prépondérance du second de ces deux effets.

4) $7{,}5 < pH < 8$.

Les gradients de pH toujours négatifs inversent leurs effets dans les deux branches du fait du changement de signe de la charge de l'ion protéique. Leur influence devient prépondérante (le potentiel de membrane ou gradient de pH croît en valeur négative ; l'affinité PA diminue).

a) *Branche ascendante positive :* ces gradients favorisent la diffusion des frontières qui s'étalent et rendent imperceptibles l'anomalie ζ' en aval de laquelle devrait se former PA_{ν}.

b) *Branche descendante négative :* le complexe $PA_{\nu+2}$ formé en amont de ζ présente une frontière resserrée sous l'effet du gradient négatif de pH.

5) $pH > 8$.

La diminution, puis l'annulation de la charge positive de l'ion protéique tendent à annihiler son affinité pour les anions. Absence des anomalies ζ.

Enfin, l'influence de l'état électrique de P sur le degré ν de la combinaison PA_{ν} a pu être également précisée par l'étude de la courbe représentative de la fonction : $U = f\ (pH)$ (fig. 38). A $pH < pH_i$, la dérivée de cette fonction est négative et croissante, sa valeur absolue moyenne correspond à celle de l'incrément $\Delta U/\Delta pH = 5{,}0$. A $pH > pH_i$, la dérivée de cette fonction est positive et décroissante, sa valeur absolue moyenne correspond à celle de l'incrément $\Delta U/\Delta pH = 8{,}5$.

Les différences constatées, d'une part, entre les formes et, d'autre part, entre les valeurs de ces deux dérivées, sont la conséquence d'une affinité protéine-anion inversement proportionnelle au pH et plus importante à $pH < pH_i$ qu'à $pH > pH_i$.

B. — Proportion relative des ions A^- et P^+ mis en présence.

L'équation générale de Longsworth obéit à la loi d'action de masse. On conçoit, dès lors, que les proportions relatives de $[A^-]$ et $[P^+]$ influent sur l'état final d'équilibre.

1) *Influence de la force ionique à concentration protéique (C_1 = 1 g./100 ml.) et pH (pH = 6,5) constants.*

a) *Sur les frontières mobiles :* Nous avons établi que l'élévation de la force ionique a pour effet d'augmenter les incréments de conductivité dialytiques (§ I. A. 1. a.). L'augmentation de ces derniers traduit un accroissement de l'affinité : protéine-anion. On doit, dès lors, s'attendre à ce que les anomalies augmentent avec la force ionique du milieu soumis à l'électrophorèse.

En fait, les résultats expérimentaux (fig. 40) démontrent que, dans la branche positive, la proportion de PA_ν délimitée par l'anomalie ζ augmente de I = 0,0044 à I = 0,058, mais qu'aux valeurs plus élevées, les frontières *3* + *4* et l'anomalie ζ deviennent confluentes. La mauvaise résolution des frontières *3* et *4* est liée à l'abaissement du potentiel électrocinétique. Quant à la discontinuité ζ elle est d'autant moins accentuée que la différence absolue des mobilités des combinaisons protéine-anions qu'elle sépare est plus faible. Cette différence diminue en même temps que le gradient négatif de pH dont l'interface est le siège. En d'autres termes, elle est fonction du pouvoir tampon du milieu, c'est-à-dire de sa force ionique. En outre, aux très faibles forces ioniques (de l'ordre de 0,005), la disparition de l'anomalie ζ va de pair avec le fait que $(\Delta\chi)_{D\ obs.}$ et $(\Delta\chi)_{D\ calc.}$ tendent vers des valeurs identiques (§ I. A. 1. a. et tableau XVII).

Dans la branche négative, l'influence de l'anomalie ζ' sur la proportion du pic *1* est difficile à apprécier au-dessus de I = 0,058 en raison de la mauvaise résolution des frontières *3* et *4*. Aux très faibles forces ioniques, ces dernières sont par contre nettement individualisées. Leur finesse excessive et leur étroite proximité contrastent avec la séparation et l'étalement qu'elles présentent dans la branche positive. Cette dissymétrie entre dans le cadre des anomalies classiques des frontières mobiles en tampon de faible force ionique.

Un autre aspect de l'influence des proportions relatives de $[A^-]$ sur les frontières mobiles nous est donné par l'exemple suivant :

Le pic *5* correspond à la description qu'ont faite de la frontière *f* Berry et coll. [16] en étudiant dans des conditions identiques aux nôtres (tampon cacodylique de faible force ionique et de pH = 6,5) le comportement électrophorétique de COHb A. Ces auteurs ont observé notamment l'augmentation progressive de

cette frontière incolore en faisant successivement migrer la protéine (C_1 = 1,2 g. / 100 ml., I = 0,05) dans des milieux de force ionique croissant de 0,047 à 0,053.

En d'autres termes, en superposant artificiellement une frontière protéique à un gradient de conductivité de plus en plus négatif, on favorise, en dessous du pH_i, le passage de la combinaison $PA_{\nu+1}$ à celle de degré supérieur $PA_{\nu+2}$. Ce résultat que nous avons pu par ailleurs reproduire, paraît confirmer l'interprétation donnée au § II. A. 1. a.

b) *Sur les mobilités :* L'élévation de la mobilité de l'ion protéique par dilution de la solution tampon résulte des deux effets suivants :

1° Elévation du potentiel électrocinétique de la particule protéique ;

2° Abaissement du degré ν de la combinaison PA_ν (pH < pH_i).

L'étude expérimentale (§ I. B. 3. a.) nous a révélé un accroissement brusque de la fonction $U = f(\sqrt{I})$ (fig. 39) pour I < 0,00875 (— log [A⁻] = 2,94). Nous admettons que cette discontinuité traduit une chute brusque du degré ν de la combinaison PA_ν (réaction stoechiométrique) provoquée par un abaissement de la concentration [A⁻] en dessous d'une valeur critique. Cette hypothèse est en accord avec les données expérimentales de Scatchard et coll. (fig. 7, p. 96 [94]) démontrant un abaissement rapide du degré ν en dessous de — log [A⁻] = 1.

Dès lors, il devient possible de dresser le bilan des groupements basiques de P^+ combinés avec les anions A^- si l'on admet que la différence relative entre les mobilités $(U_p)_o$ = 8,86 et $(U_{pA})_o$ = 7,87 (fig. 39) est proportionnelle à l'augmentation relative de la charge $\Delta z_p / z_p$ lorsque P^+ ne se combine plus à A^-. On obtient la proportion de 13 groupements basiques réactifs pour 100. Ainsi, l'ion carboxyhémoglobinique PA_ν présente à l'électrophorèse en milieu cacodylique I = 0,0175, pH = 6,5, θ = + 2° C, une charge nette moyenne de + 5,34 (time-average) avec ν = 0,7.

2) *Influence de la concentration C_1 à force ionique (I = 0,0175 et pH (pH = 6,5) constants.*

L'expérience montre que, dans la branche positive, la proportion de PA_ν stable limitée dans la partie droite du gradient de concentration protéique (fig. 41) par l'anomalie ζ diminue régulièrement en fonction de C_1 puis s'annule ou demeure très faible pour des concentrations C_1 > 1,12 g. /100 ml. En d'autres termes, la couche située au-dessus de la limite ζ, et dans laquelle $[A^-]/[PA_{\nu+1}{}^+] \geqslant 1$, diminue en fonction de C_1. Pour $C_1 > 1,12$, qui correspond au rapport $[A^-] / M_{COHb} < 100$, on obtient à tous les niveaux de la veine liquide : $[A^-] / [PA_{\nu+1}{}^+] < 1$, $[PA_{\nu+1}{}^+]$ se trouvant en excès par rapport à $[A^-]$.

Dans la branche négative, la diminution du pic 5 en fonction de C_1 s'interprète de la même manière. Toutefois, l'augmentation des gradients réfractométriques et des gradients négatifs de pH allant de pair avec l'augmentation de C_1, l'évolution de l'anomalie ζ' ne peut être observée aux concentrations $C_1 \geqslant 1{,}12$ g. /100 ml.

C. — Valence de l'anion A

L'influence de la valence des anions a été étudiée à $pH < pH_i$, condition la plus favorable aux manifestations de l'affinité protéine-anion.

L'étude de l'incrément $(\Delta\chi)_D$ nous a permis d'établir que l'équilibre dialytique observé dépend de la valence de l'anion du tampon (§ I. A. 1. b.). A force ionique constante, cet équilibre s'écarte d'autant plus de celui prévu par les lois de Donnan que le rang occupé par l'anion dans la série suivante est plus élevé : chlorure, acétate, cacodylate-chlorure, cacodylate, mono- et di-phosphate, citrate. Cette série rappelle celle d'Hofmeister et rend compte de l'ordre d'affinité croissante de la protéine pour ces divers anions [68, 94].

L'effet de la valence des anions sur les diagrammes électrophorétiques (§ I. B. 1) peut dès lors s'interpréter comme suit :

1. — Branche ascendante négative.

L'élévation de la valence de l'anion a pour effet d'accroître le rapport $[P_{(4)} A_{\nu+2}] / [P_{(4)} A_{\nu+1}]$ en déplaçant l'équilibre (8) vers la droite. L'accumulation de $P_{(4)} A_{\nu+2}$ dans la veine liquide sous-jacente à l'anomalie ζ' engendre un gradient de concentration protéique négatif — et, de ce fait, instable — au niveau de la frontière *3*. Aussi, l'interface protéine/tampon se réduit-il à une frontière unique dont la mobilité constante correspond à celle de $P_{(4)} A_{\nu+2}$ et dont le gradient réfractométrique tend vers l'infini (fig. 45).

De telles frontières ont été observées par Davis et Cohn [26] au cours de l'électrophorèse de carboxyhémoglobine en présence d'anions phosphoriques ou citriques.

2. — Branche descendante positive.

L'élévation de la valence de l'anion a pour effet d'abaisser le rapport $[P_{(3)} A_{\nu}] / [P_{(3)} A_{\nu+1}]$ en s'opposant au déplacement vers la droite de l'équilibre (9). La quantité de $P_{(3)} A_{\nu}$ stable formé est insuffisante pour faire apparaître l'anomalie ζ. La diffusion des frontières *3* et *4* est libre et leur étalement correspond à l'effet normal d'un gradient négatif de pH (fig. 45).

En résumé, quel que soit le pH adopté, la branche négative est *seule* le siège de la perturbation engendrée par les anions polyvalents, à faible force ionique. Il en résulte la conséquence pratique suivante :

Au cours des électrophorèses opérées dans ces conditions, *ne sont interprétables par la théorie classique que les diagrammes enregistrés dans la branche descendante lorsque* $pH < pH_i$, *et ceux enregistrés dans la branche ascendante lorsque* $pH > pH_i$. Cette notion précise les limites de validité de celle généralement admise à la suite des travaux de Hoch [15] sur l'électrophorèse de COHb A en tampon phosphorique de pH = 8,2 et de force ionique = 0,03, et selon laquelle la branche descendante serait seule le siège de perturbations.

Enfin, il est remarquable que l'on obtienne, dans la branche descendante positive, des diagrammes identiques en jouant indépendamment sur l'un des paramètres de l'équilibre (9) (valence de l'anion du tampon, force ionique ou concentration protéique) susceptibles d'éliminer l'anomalie ζ (fig. 45 ; fig. 40, I = 0,0044 ; fig. 41, C_1 = 1,48).

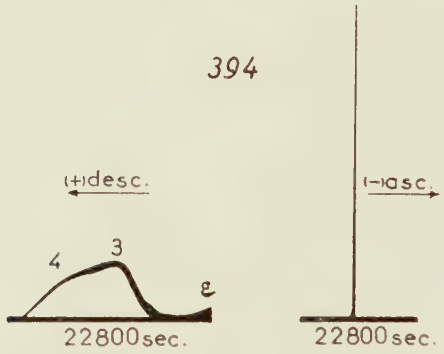


FIGURE 45. — Electrophorèse de carboxyhémoglobine humaine adulte. C_1 = 1 g. 100 ml. ; $PO_4H_2^-$, PO_4H^{--} ; I = 0,012, pH = 6,46

Chapitre III

ANOMALIES DE FRONTIERES ET HETEROGENEITE DE L'HEMOGLOBINE DE L'HOMME ADULTE NORMAL

L'hétérogénéité électrophorétique de la carboxyhémoglobine de l'homme adulte normal, en tampon cacodylique de faible force ionique et de pH < pH_1 a été observée au cours de recherches antérieures [32, 33, 34, 99, 16] et décrite dans l'introduction (cf. p. 11 et fig. 1 et 2). Nous avons montré qu'elle se manifeste régulièrement par la séparation des deux constituants très largement majoritaires désignés par *3* et *4* dans l'ordre de leur mobilité croissante et de trois constituants en très faible proportion.

Nous envisagerons successivement le cas de ces deux groupes de constituants, le premier de ceux-ci correspondant au pigment et en représentant la quasi totalité.

I. — Constituants minoritaires

Des trois constituants de ce groupe individualisés en tampon $caco^-$ Cl^-, I = 0,0175, pH = 6,5, le plus rapide ($U_a = + 5{,}2.\ 10^{-5}$) désigné par *5* a été assimilé dans le chapitre précédent à une faible quantité de pigment donnant avec les anions du tampon la combinaison de degré supérieur $PA_{\nu+2}$ (cf. p. 120).

Le constituant *2* ($U_a = + 4,4. 10^{-5}$) n'a encore pu être identifié ni à une protéine d'accompagnement ni à une fraction hémoglobinique minoritaire telle que l'hémoglobine A_2 de KUNKEL et WALLENIUS [60]. Tel est également le cas du constituant inconstant désigné par *0* sur les figures 27 et 35.

Par contre, nous avons pu établir que le constituant *1* correspond à la protéine X_1, d'origine endoglobulaire [20, 64] et présente à raison d'environ 1,5 p. 100 des protéines totales dans les préparations purifiées d'hémoglobine de sujets adultes [29]. En effet, isolée selon une technique décrite [31], cette protéine présente une mobilité identique à celle du constituant *1* auquel elle se superpose, aussi bien en tampon cacodylique (fig. 46, diagramme 464) qu'en tampon phosphate alcalin (fig. 46, diagramme 465) lorsqu'on l'ajoute à la préparation d'hémoglobine.

Sa mobilité est respectivement de $+ 1,7. 10^{-5}$ en tampon $caco^-$, Cl^-, $I = 0,0175$, $pH = 6,52$, de $— 2,3. 10^{-5}$ en tampon PO_4^{---}, $I = 0,03$, $pH = 8,26$ et de $— 1,68. 10^{-5}$ en tampon PO_4^{---}, PO_4^{--}, $I = 0,2$, $pH = 7,68$. Le constituant *1* (ou protéine X_1) présente dans ce dernier tampon (fig. 46, diagramme 466) la mobilité d'une γ_1-globuline sérique ; il est alors précédé par un constituant légèrement plus rapide, en faible proportion et provisoirement assimilé à la protéine X_2 dont la présence est également révélée par électrophorèse sur papier [31]. En tampon cacodylique $I = 0,0175$, le pH_i de la protéine X_1 a été évalué à 7,40.

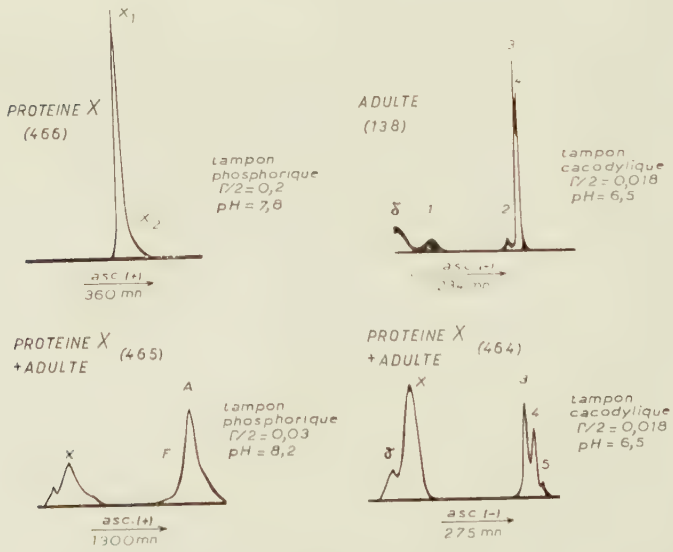


FIGURE 46. — Diagrammes électrophorétiques de la protéine X et de son mélange avec la carboxyhémoglobine adulte

Il est remarquable que cette protéine migre toujours plus lentement que l'hémoglobine, quelque soit le signe de sa charge. Aussi peut-on admettre que les droites représentant respectivement la variation de la mobilité de la protéine X_1 et de la carboxyhémoglobine en fonction du pH ont une pente différente — celle de la première étant inférieure à celle de la seconde — et que leur intersection correspond à un pH très légèrement supérieur au pH_i de l'hémoglobine ($pH_i = 7{,}51$).

Enfin, en accord avec Stern et coll. [104], nous avons toujours observé qu'une suspension incolore migre vers l'anode.

II. — Constituants majoritaires (hémoglobine)

Il a été suggéré que cette hétérogénéité pourrait résulter soit d'impuretés apportées par l'acide cacodylique [48] soit de la dissociation de l'hémoglobine en plusieurs unités élémentaires [99]. De telles hypothèses ne sauraient être retenues car, dans des conditions comparables de pH et de force ionique, la substitution de tampons acéto-acétiques ou même d'une solution de chlorure de sodium au tampon cacodylique n'élimine pas l'hétérogénéité du chromoprotéide (cf. Chap. II) dont l'ultracentrifugation démontre, par ailleurs, l'homogénéité de taille moléculaire (molécules entières) en milieu cacodylique [33].

Mais, avant d'admettre, sur ces bases l'existence de plus d'une hémoglobine dans les hématies de l'adulte, il importait de s'assurer que l'hétérogénéité observée n'est due ni à la formation d'une frontière anormale, ni à des interactions protéine-ions, ni à l'oxydation partielle du pigment en ferrihémoglobine.

Nous nous sommes proposés de contrôler la validité de ces trois hypothèses, d'une part, par l'étude des fausses frontières développées dans le système ionique utilisé et, d'autre part, par l'étude de l'influence de l'affinité protéine-anions, précédemment discutée (cf. Chap. II), sur le comportement électrophorétique comparé de la carboxyhémoglobine, de la ferrihémoglobine et de leurs mélanges.

I. — Détermination des frontières anormales.

La théorie classique [36, 106] permet de calculer le nombre et la mobilité des frontières anormales développées dans un système ionique déterminé. La figure 47 rend compte des résultats de son application au système mis en jeu par les conditions expérimentales adoptées : $COHb\ A^+$, $Caco^-$, Cl^-, Na^+ ; $I = 0{,}0175$; $pH = 6{,}5$.

Le nombre et la valeur des racines de la fonction $B(U) = f(U)$ sont respectivement fournis par le nombre et la position des intersections de la courbe représentative avec l'axe des abscisses U.

Des deux racines ainsi définies, l'une représente la frontière anormale stationnaire δ (U = 0), l'autre une frontière anormale de mobilité $x'' = -19{,}87 . 10^{-5}$.

La mobilité des deux frontières *3* et *4* de la carboxyhémoglobine étant respectivement égale à : $+ 5{,}0 . 10^{-5}$ et $+ 5{,}1 . 10^{-5}$, il apparaît ainsi que la frontière mobile anormale ne peut correspondre à aucune de ces deux frontières.

II. — Affinité protéine-anions.

Au cours du chapitre précédent, nous avons pu relier aux conséquences des affinités protéine-anions les anomalies de l'électrophorèse n'entrant pas dans le cadre de celles prévues par l'extension de la théorie classique au cas des électrolytes faibles [10, 107, 22, 6]. Nous nous proposons de fournir de nouvelles indications en faveur de la validité de l'interprétation proposée et, par là, de confirmer l'existence de deux hémoglobines, électrophorétiquement distinctes, dans les hématies de l'homme adulte normal.

A) Cas de l'oxy- et de la carboxyhémoglobine.

Les diagrammes ascendants enregistrés à partir de l'oxy- et de la carboxyhémoglobine en tampon : acide de cacodylique 0,00125 M — cacodylate de sodium 0,005 M — chlorure de sodium 0,0125 M.

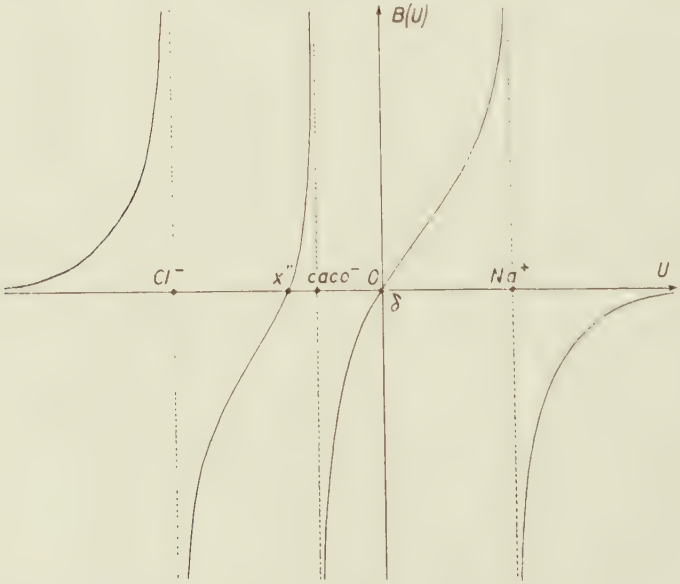


Figure 47. — Fonction B (U). L'intersection de cette courbe avec l'axe des mobilités U détermine la mobilité x'' de la frontière mobile anormale développée dans le système : COHb A+, caco.—, Cl—, Na+ ; I = 0,0175 ; pH = 6,5

de pH = 6,5 et de force ionique = 0,0175, sont identiques. Les constituants *3* et *1* représentent pratiquement la totalité de l'hémoglobine et le tableau XXIV rend compte de leurs proportions respectives. Ils présentent des mobilités très voisines ($U_{a3} = + 5{,}0.\ 10^{-5}$; $U_{a1} = + 5{,}1.\ 10^{-5}$) et leur différence de charge nette moyenne, calculée à partir de l'équation (4a) de Hoch [42], est égale à 0,11. Par ailleurs, l'anomalie ζ' précédemment étudiée affecte la frontière *1* en entravant sa diffusion, en accroissant son gradient de concentration et en donnant naissance à une très faible quantité d'un constituant *5* légèrement plus mobile.

La résolution satisfaisante de ces frontières ascendantes résulte du gradient négatif de pH existant entre la solution protéique et la solution tampon. Par contre, ce gradient négatif a pour effet d'étaler les frontières descendantes et de les rendre confluentes. L'anomalie ζ se manifeste par une discontinuité de la frontière *3*.

Si, comme nous avons été conduit à l'admettre, les anomalies ζ et ζ' affectant les interfaces protéine/tampon sont les manifestations essentielles de l'effet perturbateur des interactions protéine-anions, il doit être possible d'en préserver les frontières de l'hémoglobine dans les cas suivants :

1° Préservation de la frontière *3* descendante par addition d'une protéine nettement moins mobile.

2° Préservation de la frontière *1* ascendante par addition d'une protéine nettement plus mobile.

La figure 48 rend compte des résultats expérimentaux obtenus par l'électrophorèse, dans les conditions standard adoptées, de mélanges en proportions égales de carboxyhémoglobine et de protéine 1 (X_1), d'une part (diagrammes 464), de carboxyhémoglobine et de thymohistone, d'autre part (diagrammes 509).

L'examen des diagrammes 464 permet de constater qu'en accord avec nos prévisions, les anomalies ζ et ζ' demeurent localisées au niveau des interfaces protéine/tampon (interface COHb/tampon dans la branche ascendante et interface protéine *1*/tampon dans la branche descendante). La forme particulièrement aiguë de l'anomalie ζ peut être interprétée comme suit : En raison de la faible mobilité de *1*, la fraction $P_{(1)}\ A_{\nu}$ située au-dessus de la limite ζ se superpose à une partie du gradient ε et se trouve de ce fait dans un milieu de conductivité plus faible que celui de la solution « ajustée » renfermant $P_{(1)}\ A_{\nu+1}$ et située au-dessous de la limite ζ. Ce gradient positif de conductivité a pour effet d'affiner les frontières situées dans le voisinage *immédiat* de cette limite.

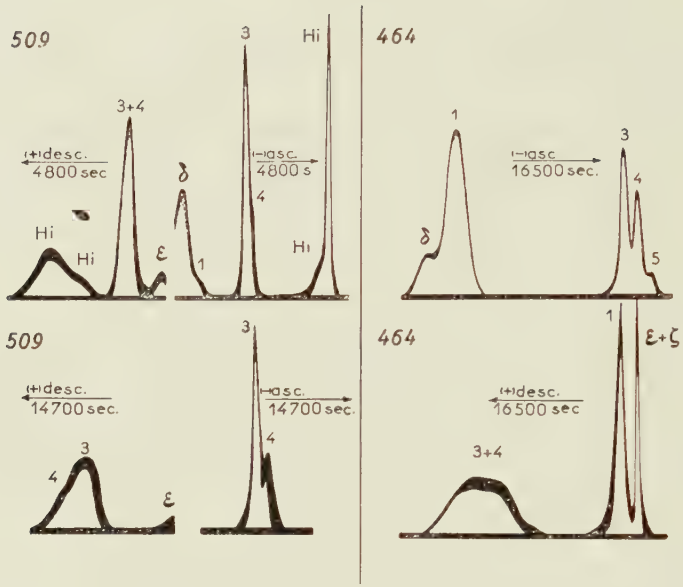


FIGURE 48. — *509 :* Mélange en parties égales de COHb A (1,0 g. / 100 ml. ; U = + 6. 10-5) et d'histone (Hi) (1,0 g. /100 ml. ; U = + 14. 10-5) Solution tampon : caco. —, Cl— ; I = 0,0175 ; pH = 6,5

464 : Mélange en parties égales de COHb A (1,0 g. / 100 ml. ; U = + 5. 10-5) et de protéine X (fraction 1), (1,0 g. /100 ml. ; U = + 1,7. 10-5). Solution tampon caco. —, Cl— ; I = 0,0175 ; pH = 6,5

Dans le cas des mélanges de carboxyhémoglobine et d'histone (diagrammes 509), on constate que, dans la branche ascendante, l'interface protéine/tampon, c'est-à-dire la frontière très rapide de l'histone, est seule le siège des perturbations. Elles se manifestent successivement au cours de l'électrophorèse par un aplatissement de cette frontière puis, après 5.000 sec., par son instabilité. Conformément à nos prévisions, les frontières du chromoprotéide ne présentent aucune anomalie ζ (diffusion normale des frontières), la proportion apparente du constituant *4* s'abaisse à 24 p. 100 et l'écart entre les mobilités des deux frontières augmente. En appliquant à la proportion apparente du constituant *4* les calculs de correction relatifs aux gradients superposés [44, 88] on obtient le pourcentage réel du constituant *4*, soit 17 p. 100 valeur voisine du pourcentage apparent moyen obtenu dans les conditions expérimentales standard adoptées (tableau XXIV). Ce fait confirme l'indépendance des constituants *3* et *4* [44, 106].

Dans la branche descendante, l'absence d'anomalie ζ au niveau de la frontière *3* peut être attribuée à la grande affinité de l'histone pour les anions du tampon. Cette affinité est démontrée, selon nos conceptions (cf. chap. II), par l'instabilité de la frontière ascendante de l'histone et se manifeste dans des conditions expérimen-

tales où les frontières de carboxyhémoglobine sont stables. On peut en déduire que l'affinité de l'histone pour les anions est supérieure à celle de la carboxyhémoglobine. On conçoit, dès lors, que l'addition de la première à la seconde élève l'affinité du mélange pour les anions et atténue ou supprime l'anomalie ζ par un effet comparable à celui résultant de l'accroissement de l'affinité de la seule carboxyhémoglobine par élévation de sa concentration ou emploi de tampons renfermant des anions polyvalents (cf. chap. II). Ces divers artifices conduisent tous à l'enregistrement de diagrammes descendants similaires.

La figure 49, qui reproduit à titre d'exemple l'analyse géométrique de l'un d'entre eux (diagramme 394 de la figure 51), démontre la présence dans la carboxyhémoglobine d'adulte de deux constituants électrophorétiquement distincts. On sait que la distorsion du gradient de concentration d'une protéine *homogène* (courbe de Gauss) sous les influences conjuguées de la conductivité et du pH, est proportionnelle à l'angle que fait la droite passant par le premier moment (ordonnée centroïde [36, 66]) et le sommet (dérivée nulle) avec la normale à la ligne de base. Les deux gradients de concentration confluents représentés sur la figure 49 sont soumis à un effet de distorsion commun et identique. Les droites passant par le premier moment m_1 de chaque gradient et leur sommet respectif sont parallèles entre elles (effet de distorsion

TABLEAU XXIV

EXP. N°	Pourcentage apparent de la fraction rapide *4* C'_1 %	Pourcentage réel (1) de la fraction rapide *4* C'_1 %
118	52,0	20,6
123	55,5	24,0
138	59,2	28,0
141	44,6	14,6
145	52,0	20,6
217	46,7	16,0
227	54,2	22,8
237	46,3	16,0
242	46,2	16,0
451	47,5	16,4
Moyenne	50,4	19,5
509	24,3	17,0

(1) $C'_1 = (C'_1/100)^a$ ([88], équation (3)) (cf. p. 69). Dans les conditions adoptées, la valeur moyenne expérimentale de l'exposant *a* est de 2,4 pour les électrophorèses numérotées de 118 à 451. Cette valeur s'abaisse à 1,3 dans le cas des électrophorèses pratiquées dans les conditions expérimentales particulières définies dans le texte (N° 509).

commun) et sécantes à la droite passant par le premier moment M_1 et le sommet du gradient total. Le fait que la droite passant par M_1 ne soit pas parallèle aux deux autres droites confirme l'hétérogénéité du gradient total. En effet, seul un gradient homogène se prête à une décomposition en courbes de Gauss d'ordonnées centroïdes parallèles à la sienne.

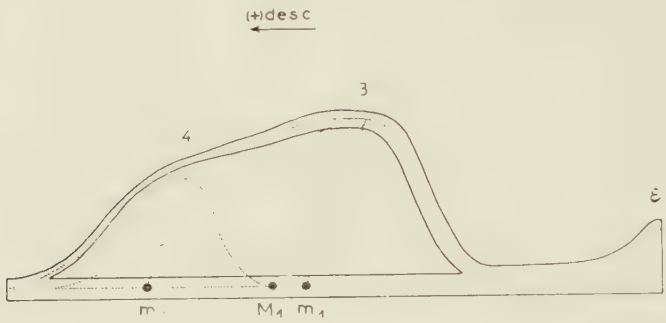


Figure 49. — Analyse géométrique de la branche descendante n° 394 de la figure 51 (explication dans le texte)

B) Cas des mélanges de carboxy- et de ferrihémoglobine.

Cette étude a porté sur des préparations de carboxy-hémoglobine traitées par des quantités relatives variables de ferricyanure et renfermant de 10 à 90 p. 100 de ferrihémoglobine (déterminations spectrophotométriques) après dialyse prolongée contre eau distillée.

Nous envisagerons successivement l'influence du pH et de la nature des ions du tampon, de la proportion de la methémoglobine et de l'addition de protéines de mobilité plus élevée sur le comportement électrophorétique de ces mélanges.

1) *Influence du pH (cas des mélanges renfermant de 85 à 90 p. 100 de ferrihémoglobine :*

a) $pH < pH_i$.

On constate, *dans tous les cas*, que la branche ascendante est le siège d'une instabilité qui se traduit, en présence d'anions monovalents (tampon cacodylique de pH = 6,5 et de force ionique 0,0175), par une frontière infiniment aiguë de mobilité constante ($U_a = + 5,5.\ 10^{-5}$) en dessous de laquelle d'autres sont susceptibles d'apparaître temporairement au cours d'électrophorèses prolongées (fig. 50). En présence d'anions polyvalents, une frontière unique, infiniment aiguë, est seule enregistrée (fig. 51), bien que des stries, perceptibles à l'examen direct de la cellule, perturbent la veine liquide comprise entre la frontière mobile et le ε. Leur faible réfringence ne permet pas de les enregistrer. On ne les perçoit sur les diagrammes, qu'au niveau de la frontière ε dont elles perturbent le gradient.

La branche descendante est toujours stable et dépourvue d'anomalie.

Des considérations analogues à celles résumées dans le paragraphe précédent conduisent à admettre, sur ces bases expérimentales, que l'affinité de la ferrihémoglobine pour les anions du tampon est supérieure à celle du dérivé oxycarboné du même pigment. Cette différence, manifeste dans le cas des ions monovalents, n'est plus apparente dans celui des anions polyvalents pour lequels les deux dérivés ont une forte affinité. C'est ainsi que les diagrammes de la carboxy- et de la ferrihémoglobine sont identiques en présence d'ions phosphoriques (fig. 51). Dans les deux cas, ils mettent en évidence les frontières descendantes *3* et *1*.

b) pH > pH_i (tampon diéthylbarbiturique de pH = 8,5 — 10,0 et de force ionique = 0,019).

Les diagrammes des deux branches sont énantiomorphes et ne présentent aucune anomalie (diffusion normale des frontières)

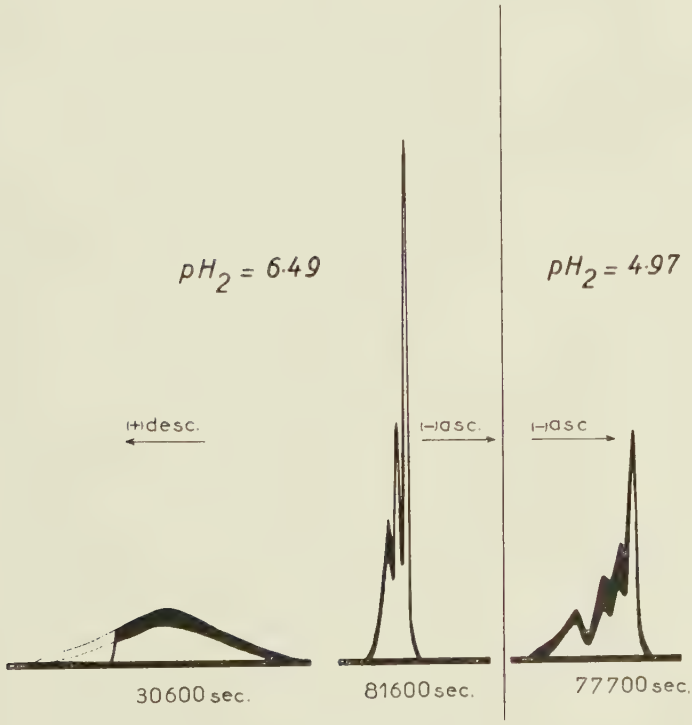


FIGURE 50. — MetHb A (90 %) + COHb A (10 %), 1 g. / 100 ml. ; tampon caco.—, Cl—; I = 0,0175

On remarque dans la branche descendante la présence de l'anomalie due à la zone d'instabilité créée en bas de la cellule par la compensation du δ

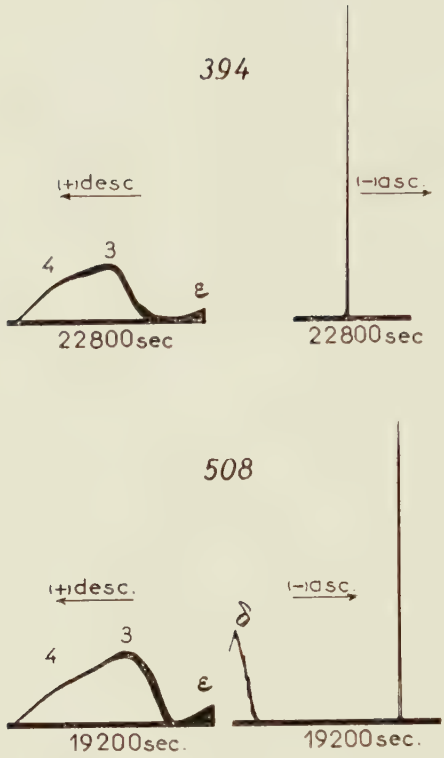


FIGURE 51. — *394 :* COHb A, 1 g. 100 ml. ; tampon PO_4H^- —, $PO_4H_2^-$ I = 0,012 ; pH = 6,46

508 : MetHb A (90 % + COHb A (10 %, 1 g. 100 ml. ; tampon PO_4H^- —, $PO_4H_2^-$; I = 0,012 ; pH = 6,46

(Le gradient δ est perturbé par des stries non apparentes sur le cliché)

(fig. 52, diagramme 516). Ils traduisent la présence d'un constituant apparemment homogène et très largement majoritaire et celle d'un constituant mineur appelé F par analogie avec les enregistrements obtenus par BEAVEN et coll. [15] dans les mêmes conditions de pH et de force ionique.

2) *Influence de la quantité relative de carboxy- et de ferrihémoglobine.*

a) pH < pH_i.

Le comportement électrophorétique des mélanges de carboxy- et de ferrihémoglobine est identique à celui du pigment oxydé lorsque la proportion de ce dernier demeure supérieure à 15 p. 100. Au-dessous de ce taux, le comportement électrophorétique est celui de la carboxyhémoglobine. On constate une évolution parallèle de la mobilité moyenne de l'interface hémoglobine/tampon qui

s'abaisse de + 5,5. 10^{-5} (90 p. 100 de ferrihémoglobine) à + 5,0. 10^{-5} (95 p. 100 de carboxyhémoglobine).

b) pH > pH_i.

Le comportement électrophorétique du pigment demeure identique, quelles que soient les quantités relatives de carboxy- et de ferrihémoglobine (fig. 52).

3) *Influence de l'addition d'une protéine plus rapide.*

Comme le démontre la figure 53 (diagrammes 510 et 519), l'addition d'histone ou de lysozyme à une préparation de carboxyhémoglobine renfermant de 25 à 65 p. 100 de ferrihémoglobine *stabilise les frontières ascendantes* sans éliminer totalement l'anomalie ζ' (présence de la fraction *5* et augmentation du constituant *4*). Celle-ci affecte essentiellement la frontière la plus rapide et plus particulièrement celle de l'histone.

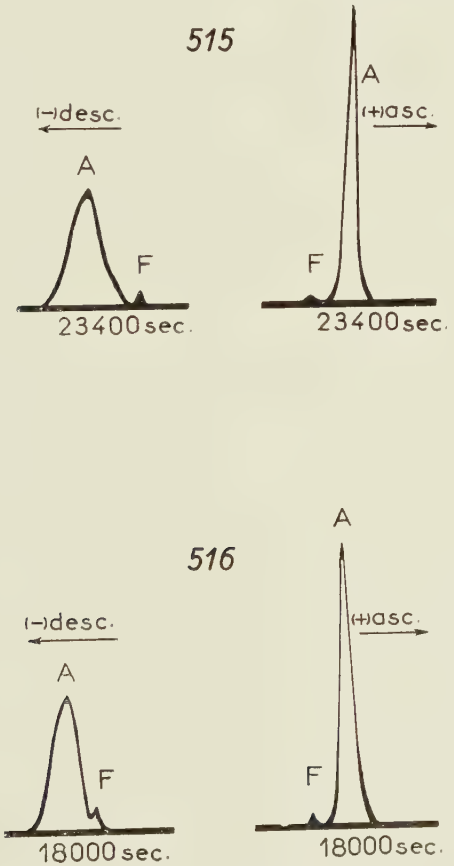


FIGURE 52. — *515 :* COHb A (95 %) + MetHb A (5 %), 1 g./100 ml ; tampon diéthylbarbiturique ; I = 0,019 ; pH = 9,0.

516 : COHb A (15 %) + MetHb A (85 %), 1 g./100 ml. ; tampon diéthylbarbiturique ; I = 0,019 ; pH = 9,0

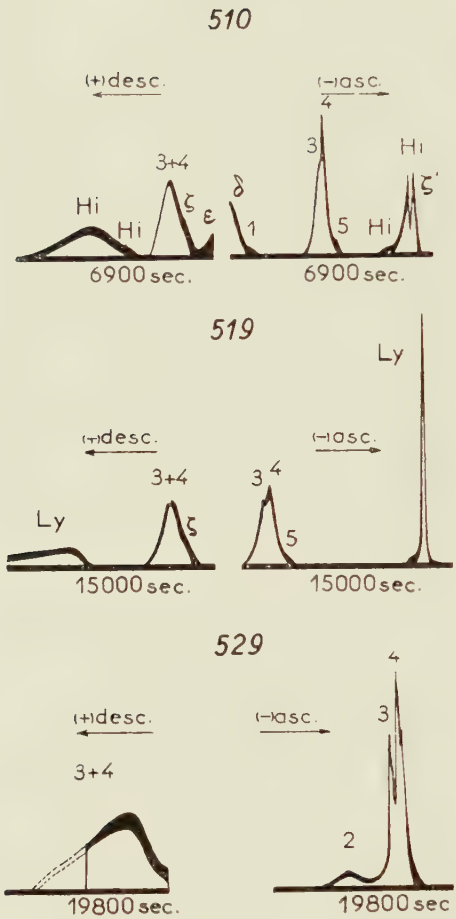


FIGURE 53. — *510 :* Mélange en parties égales d'une préparation partiellement oxydée de carboxyhémoglobine (MeHtb A = 65 %, U = 6,4 . 10^{-5}) et d'histone (Hi) (U = 14. 10^{-5}) ; concentration en protéines totales = 1 g. / 100 ml. Tampon caco. —, Cl $^-$; I = 0,0175 ; pH = 6,5

519 : Mélange en parties égales d'une préparation partiellement oxydée de carboxyhémoglobine (MetHb A = 25 %, U = 1,8 . 10^{-5}) et de lysozyme (Ly) (U = 8. 10^{-5}) ; concentration en protéines totales = 1 g. / 100 ml. Tampon PO_4H_2 , PO_4H ; I = 0,012 ; pH = 6,5

529 : CyMetHb A (90 %), 1 g. 100 ml., U = 5,2. 10^{-5}. Tampon caco. , Cl $^-$; I = 0,0175 ; pH = 6,5

C) CAS DE LA CYANMETHÉMOGLOBINE.

La cyanuration de la ferrihémoglobine a pour effet de stabiliser les frontières ascendantes comme le démontre l'examen du diagramme 529 de la figure 53. La mobilité moyenne de la cyanmethémoglobine, U_a = + 5,2. 10^{-5}, est intermédiaire à celles de la carboxy- et de la ferrihémoglobine. On peut admettre qu'il

en est de même de l'affinité de ce dérivé pour les anions. En effet, la stabilité de ses frontières ascendantes permet de constater, en plus d'une excellente résolution des constituants *3* et *4*, la présence d'une forte anomalie ζ' qui affine la frontière *4* et en augmente le gradient de concentration alors que le diagramme descendant, ne présente aucune anomalie.

D. — Conclusions.

L'ensemble des résultats qui viennent d'être exposés démontre que la séparation des constituants *3* et *4* de l'hémoglobine ne correspond ni à un artefact de l'électrophorèse (impureté des sels du tampon, frontières anormales, anomalies ζ), ni à l'oxydation partielle de l'oxy- ou de la carboxyhémoglobine. Cette dernière éventualité méritait d'être envisagée car, *dans la branche ascendante,* la formation de composés intermédiaires d'oxydation de la carboxyhémoglobine humaine d'adulte normal a été observée par Itano et Robinson [49, 50, 51, 52] en tampon PO_4^-, PO_4^{--} I = 0,010, pH = 6,8. En fait, dans des conditions expérimentales analogues, nos recherches établissent que *la branche ascendante est le siège d'une instabilité permanente* alors que les *diagrammes descendants, seuls significatifs,* ne mettent en évidence que la présence des deux constituants *3* et *4* du pigment, indépendemment du degré d'oxydation de ce dernier. De plus, la différence entre les charges nettes de ces deux constituants étant inférieure à l'unité (Δz = 0,11, cf. p. 89), l'hypothèse selon laquelle le constituant *3* correspondrait à la carboxyhémoglobine ($HbCO_4$) et le constituant *4* à sa première étape d'oxydation ($HbCO_4$ Hb^{+1}) paraît difficilement soutenable. Elle est en outre infirmée par le fait que les diagrammes ascendants de la cyanmethémoglobine en tampon cacodylique (I = 0.0175, pH = 6,5) mettent en évidence eux aussi les deux mêmes constituants.

La séparation électrophorétique de l'hémoglobine humaine d'adulte normal en deux constituants n'est pas l'unique manifestation de l'hétérogénéité de ce pigment. Nous nous bornerons à rappeler brièvement que celui-ci s'avère renfermer, d'une part, environ 1 p. 100 d'une fraction résistante à la dénaturation alcaline [40, 54, 101, 63], d'autre part, environ 2,5 p. 100 d'un constituant désigné par A_2 par Kunkel et Wallenius [60] et migrant plus lentement que la fraction principale par électrophorèse sur bloc d'amidon en milieu alcalin. Enfin, par chromatographie sur amberlite IRC-50, il se sépare en trois constituants représentant respectivement 10 p. 100, 84 p. 100 et 6 p. 100 dans l'ordre de leur élution [75, 24], les deux premiers ayant seuls été retrouvés dans des conditions expérimentales différentes par Huisman et Prins [45, 80] et par Allen, Schroeder et Balog [11]. L'établissement d'une corrélation entre ces divers résultats, tous soigneusement établis et dont la validité a été contrôlée, paraît

difficilement réalisable à partir des seules données quantitatives. Il semble, dès lors, que l'on doive admettre que l'hémoglobine de l'homme adulte normal renferme plus de constituants que n'en révèle chacune des techniques utilisées, confirmant ainsi l'opinion formulée par DERRIEN sur la base des données fournies par l'étude des caractères de solubilité de ce pigment [27, 28, 30].

Enfin, le fait que les constituants *3* et *4* ne se séparent qu'à des pH inférieurs à leur pH_i et demeurent confondus à des pH supérieurs à leur pH_i peut être interprété sur la base des données établies par SCHEINBERG et coll. [98]. Ces auteurs ont en effet démontré que si les hémoglobines A (type adulte normal), S et C (hémoglobines anormales) sont bien caractérisées par leurs différences relatives de vitesse de migration en tampon de pH alcalin ou voisin de la neutralité, il n'en est plus de même en tampon de pH nettement inférieur au point isoélectrique de ces pigments : leur vitesse de migration est identique à pH = 3,35-4,08. SCHEINBERG et coll. ont déduit de telles observations que ces hémoglobines diffèrent par le nombre de leurs groupements carboxyliques dissociables. La validité de cette déduction a été ultérieurement confirmée et précisée par INGRAM [46, 47]. Par analogie, ces faits suggèrent que les constituants *3* et *4* du pigment de l'adulte normal diffèrent notamment par le nombre de leurs groupements basiques dissociables. L'étude de ce problème ne pourra être entreprise qu'après isolement de ces constituants.

Chapitre IV

ETUDE COMPAREE DU COMPORTEMENT ELECTROPHORETIQUE EN TAMPON CACODYLIQUE DE FAIBLE FORCE IONIQUE DES CARBOXYHEMOGLOBINES D'ADULTE, DE NOUVEAU-NE ET DE SUJETS ATTEINTS D'ANEMIE DE COOLEY

De pH isoélectrique très voisins [110], les hémoglobines de type adulte (Hb A) et de type foetal (Hb F) sont pratiquement indifférenciables dans l'appareil de Tiselius en tampons acides ou alcalins de force ionique I = 0,1, couramment utilisés pour l'individualisation et la caractérisation électrophorétique des hémoglobines anormales.

Mettant à profit l'accroissement du pouvoir de résolution lié à l'abaissement de la force ionique de la solution saline, Hoch et ses collaborateurs [15] ont obtenu la séparation d'Hb A et d'Hb F en tampon phosphate disodique, I = 0,03, pH = 8,2. Mais, à ce pH, Hb A et Hb F sont apparemment homogènes et le comportement électrophorétique du pigment foetal est identique à celui de l'hémoglobine alcalinorésistante des sujets atteints d'anémie de Cooley (Rich [89]). Tel n'est plus le cas à pH 6,5 en tampon caco$^-$, Cl$^-$; I = 0,0175 dans lequel nous avons vu que l'hétérogénéité d'Hb A se manifeste régulièrement par la séparation des constituants *3* et *4* (cf. fig. 1, 2).

La figure 54 permet de comparer le comportement électrophorétique, dans ce même tampon et dans des conditions expérimentales rigoureusement identiques, des carboxyhémoglobines de l'adulte, des nouveau-nés et des sujets atteints d'anémie de Cooley.

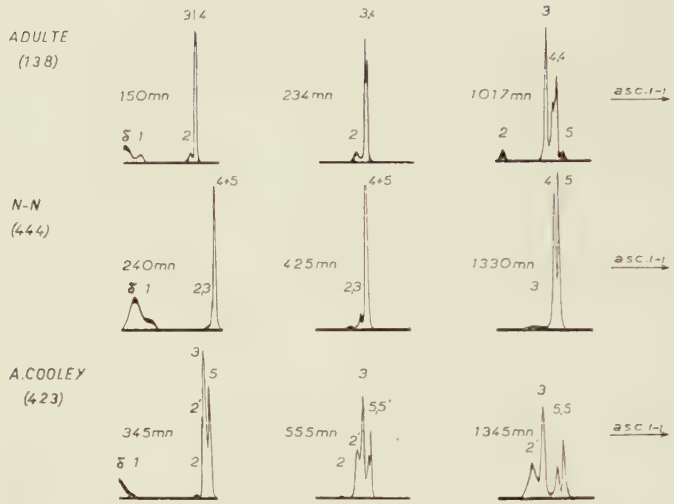


FIGURE 54. — Diagrammes d'électrophorèse en tampon cacodylique, I = 0,0175, pH = 6,50 de carboxyhémoglobine d'adulte (138), de nouveau-né (444) et de thalassémique (423)

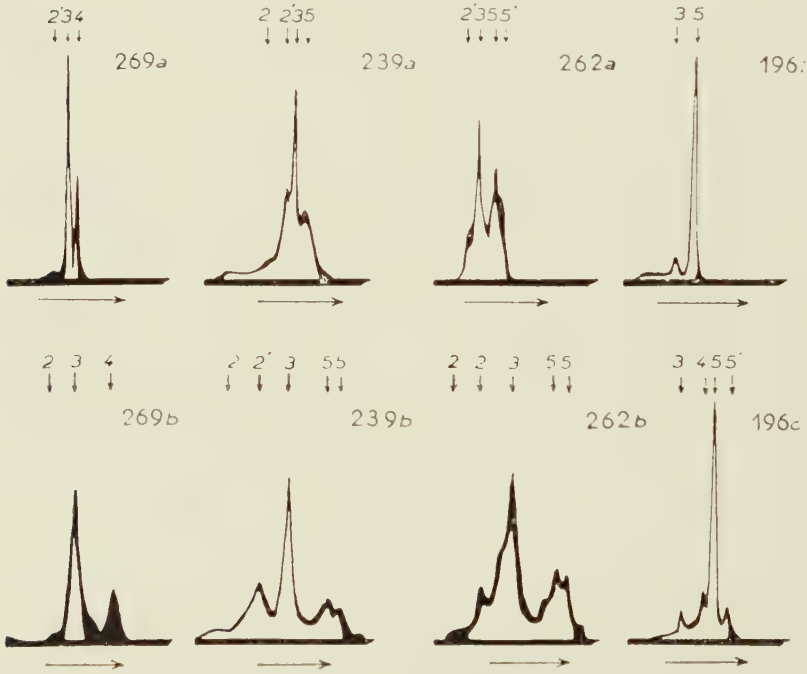


FIGURE 55. — Diagrammes d'électrophorèse enregistrés à deux temps différents à partir de carboxyhémoglobines de thalassémiques (Thalassémie minime : N° 269 : *a*) 5 h. 10 min. ; *b*) 21 h. 20 min. ; Thalassémies majeures : N° 239 : R. D. A., 68 % ; *a*) 6 h. 47 min. ; *b*) 24 h. 24 min. et N° 262 : R. D. A., 90 % ; *a*) 7 h. 52 min. ; *b*) 16 h. 55 min.) et de nouveau-né (N° 196 : R. D. A., 75 % ; *b*) 7 h. 30 min. ; *c*) 21 h. 41 min.)

A. — Résultats expérimentaux

1° *La carboxyhémoglobine du nouveau-né* fournit des diagrammes ((444), fig. 54 et (196), fig. 55) nettement distincts de ceux enregistrés à partir des pigments de l'adulte en ce qu'ils ne mettent en évidence que de faibles quantités du constituant *3* et traduisent la présence d'un constituant plus rapide largement prédominant. Ce dernier se sépare généralement en *4* et *5* au cours d'électrophorèses prolongées.

2° *La carboxyhémoglobine des sujets atteints d'anémie de* Cooley (60 à 90 % de fraction alcalinorésistante) est totalement différente de celle du nouveau-né comme le montre la comparaison des diagrammes 423 et 444 de la figure 54 et de la figure 55. Le constituant *3* est toujours prédominant tandis que le constituant *4* est généralement absent. Le pic *5* se subdivise en *5* et *5'*. Par ailleurs, un constituant supplémentaire, désigné par *2'*, est constamment présent.

B. — Discussion

Alors que les carboxyhémoglobines de l'adulte, du nouveau-né et des sujets atteints d'anémie de Cooley sont homogènes et présentent une mobilité pratiquement identique en tampon cacodylique de pH 6,5 et de force ionique 0,1, nos recherches démontrent qu'il suffit d'abaisser la force ionique de ce tampon pour obtenir des diagrammes totalement différents et caractéristiques de chacun des pigments étudiés.

En l'état actuel de nos recherches sur le comportement électrophorétique des hémoglobines humaines normales et anormales, le constituant *2'* n'a été observé que chez les thalassémiques majeurs ou mineurs. Les constituants *3*, *1* et *5* ont respectivement des mobilités apparentes moyennes identiques chez l'adulte, le nouveau-né et l'anémique de Cooley (Tab. XXV). Ce fait est confirmé par l'analyse électrophorétique de mélanges artificiels d'hémoglobines d'adulte et de nouveau-né, d'une part, d'adulte et d'anémique de Cooley, d'autre part. Comme le montre la figure 56, les constituants de ces trois types de pigment s'additionnent en fonction de leur mobilité, sans qu'il en disparaisse un seul ou qu'il en apparaisse un nouveau.

De telles observations plaident en faveur de l'individualité de ces divers constituants. Elles rendent compte, par ailleurs, des limites du pouvoir de résolution de l'électrophorèse. En effet, si l'on compare au pigment de l'adulte normal des hémoglobines de nouveau-né et d'anémique de Cooley de teneur analogue en fraction alcalinorésistante (de l'ordre de 60 à 90 %), on constate qu'un même constituant électrophorétique, le constituant *3* par exemple, correspond à un pigment alcalinolabile chez l'adulte

et renferme nécessairement un pigment alcalinorésistant chez l'anémique de Cooley (Tab. XXVI). De plus, il apparaît que l'alcalinorésistance n'est pas l'apanage d'un seul type électrophorétique d'hémoglobine (Tab. XXVI). Enfin, bien que les hémoglobines de nouveau-né et d'anémiques de Cooley d'alcalinorésistance similaire ne puissent être différenciées ni par l'électrophorèse en tampon phosphate de pH = 8,2 et de force

TABLEAU XXV

Nomenclature et mobilité moyenne apparente des divers constituants électrophorétiques individualisés en tampon cacodylique de force ionique I = 0,0175 et de pH = 6,50

Constituants	Nature	U_a (10^{-5} . cm^2 . $volt^{-1}$. sec^{-1})
1	Protéine endoglobulaire X	+ 1,7
2	Protéine d'accompagnement (?)	+ 4,4
0	Protéine d'accompagnement (?)	—
2′	Hb RDA (thalassémies)	—
3	Hb A et Hb RDA	+ 5,0
4	Hb A	+ 5,1
4′	Hb A	—
5	Hb RDA (Hb F)	+ 5,2
ζ′	Anomalie	»

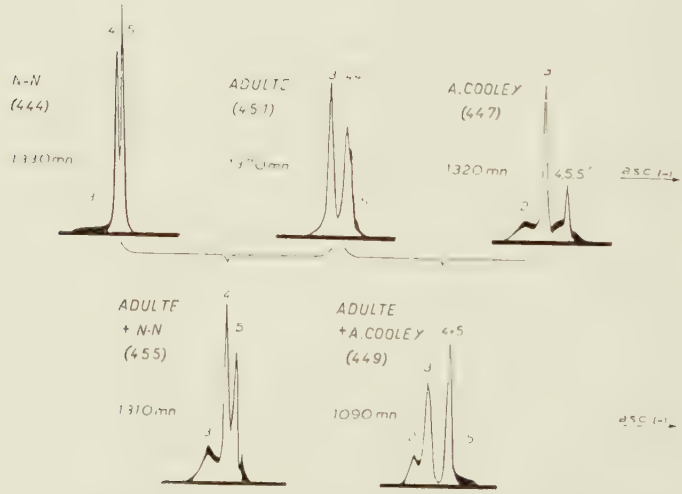


Figure 56. — Diagrammes d'électrophorèse en tampon cacodylique, I = 0,0175, pH = 6,5 de carboxyhémoglobine de nouveau-né et de thalassémique et de leur mélange respectif en proportions égales avec la carboxyhémoglobine adulte.

TABLEAU XXVI

Exp. N°	RDA %	Pourcentages des fractions calculés à partir de la planimétrie directe		
		2′	3	5 + 5′
202	60	37	53	10
421	63	21,5	42,5	36
239	68	34	39	27
447	70	22	44	34
423	80	28	37	35
335	85	7	69	24
259	90	29,5	55	15,5
262	90	18,5	43	38,5

ionique 0,03 [89], ni par leurs courbes de relargage [90], ni par leur composition chimique [91, 97], nos recherches apportent la première preuve de leur non-identité. En effet, quelle que soit l'interprétation de leur hétérogénéité — dont on peut admettre qu'elle traduit l'existence de plusieurs constituants, comme cela a été démontré dans le cas d'Hb A — les différences systématiques de leur comportement électrophorétique dans les conditions expérimentales rigoureusement standardisées que nous avons adoptées reflètent nécessairement la diversité de leur nature.

Diacono et Castay [35] ont confirmé par voie immunologique la validité de cet argument physico-chimique.

Il semble donc que l'on soit en droit d'admettre que le pigment alcalinorésistant des sujets atteints d'anémie de Cooley soit distinct d'Hb F et représente une hémoglobine anormale de « type foetal ». Une telle conception est en accord avec l'opinion exprimée dès 1955 par Dameshek dans un éditorial [25], dans lequel cet auteur s'étonne de ce que, seule des nombreuses hémopathies héréditaires connues, la thalassémie ne soit pas caractérisée par la présence d'une hémoglobine anormale et juge comme prochaine l'infirmation d'une telle exception.

—

CONCLUSIONS GÉNÉRALES

A. — Affinité protéine-anion et anomalies de frontières

1. — Il est possible de rattacher aux interactions protéines-anions à la fois les dérogations des équilibres dialytiques aux lois de Donnan et les perturbations siègeant au niveau des frontières mobiles en milieu de faible force ionique.

2. — Ces perturbations, décrites sous le nom d' « anomalie ζ », ne sont pas explicables sur la seule base des théories de l'électrophorèse faisant intervenir les électrolytes faibles. Elles représentent une discontinuité des gradients de concentration protéiques résultant de l'évolution, sous l'effet d'un champ électrique, des interactions mises en évidence par l'étude des équilibres dialytiques. Comme ces dernières, elle dépendent de l'état électrique et de la concentration de la protéine, de la force ionique du tampon et de la valence de ses anions.

3. — L'interprétation proposée rend compte également de la dissymétrie de cette anomalie dans les deux branches, de l'éventuelle instabilité des frontières et de l'incidence de l'anomalie sur la proportion apparente des constituants.

4. — En accord avec cette interprétation, il a été possible de préciser les conditions expérimentales permettant une résolution satisfaisante des frontières, sans autres perturbations que celles correspondant aux anomalies classiques.

B. — Hétérogénéité de l'hémoglobine humaine adulte

1. — Les diagrammes ascendants enregistrés au cours de l'électrophorèse de l'oxy— et de la carboxyhémoglobine en tampons mono-monovalents de pH = 6,5 et de force ionique = 0,0175 sont identiques et mettent essentiellement en évidence deux constituants. Désignés par *3* et *1* dans l'ordre de leur mobilité croissante, ils représentent respectivement 80 et 20 p. 100 du pigment total (valeurs moyennes corrigées). Ces constituants sont également individualisés par les diagrammes descendants à condition de prévenir la production de l'anomalie ζ (concentration protéique élevée, très faible force ionique ou emploi de tampon renfermant des anions polyvalents).

2. — L'hypothèse selon laquelle les constituants *3* et *4* correspondraient à des artefacts chimiques ou physicochimiques est infirmée par les arguments expérimentaux suivants :

a) Il est exclu que l'un ou l'autre puisse correspondre à une frontière anormale.

b) L'oxydation partielle ou totale de la carboxyhémoglobine ne modifie pas cette hétérogénéité en tampons mono-monovalents de pH = 6,5 à condition de stabiliser les frontières ascendantes par l'addition au pigment d'une protéine de mobilité nettement supérieure, ou de supprimer l'anomalie ζ des diagrammes descendants par l'un des artifices précédemment indiqués.

c) En tampons mono-monovalents, les frontières ascendantes et descendantes de la cyanmethémoglobine sont stables et traduisent la présence des mêmes constituants *3* et *4*.

3. — L'oxy—, la carboxy—, la methémo— et la cyanmethémoglobine, qui présentent une hétérogénéité identique à pH < pH_i, sont homogènes à pH > pH_i.

4. — La diversité du comportement électrophorétique de ces dérivés (stabilité, anomalies ζ et ζ') est rattachée à la spécificité de leur affinité pour les anions du tampon.

C. — Le pigment alcalinorésistant des sujets atteints d'anémie de Cooley est distinct de l'hémoglobine fœtale

Les diagrammes enregistrés dans les mêmes conditions expérimentales à partir d'hémoglobine de sang de cordon ombilical et d'hémoglobine de sujet atteint d'anémie de Cooley, de même teneur en pigment alcalinorésistant de l'ordre de 80 p. 100, ne sont pas identiques. Le premier renferme de faibles quantités des fractions de type adulte désignées par *3* et *4* et est essentiellement constitué par les fractions fœtales *5* et *5'*. Ces dernières ne représentent que de 20 à 30 p. 100 du pigment de l'anémique de Cooley, lequel est dépourvu de constituant *4* et contient une importante fraction *3* suivie d'un constituant *2'*.

Les constituants *2'* et *3* renferment nécessairement une proportion élevée de pigment alcalinorésistant électrophorétiquement distinct de l'hémoglobine fœtale.

Dans l'un et l'autre cas, l'individualité du constituant *5'* suscite des réserves identiques à celles précédemment formulées au sujet du constituant *5* de l'hémoglobine de l'adulte.

BIBLIOGRAPHIE

1. Adair G.-S. — *Proc. Roy. Soc. London,* Series A, **120,** 573, 1928.
2. Adair G.-S. et Adair M.-E. — *Biochem. J.*, **28,** 199, 1934.
3. Adair G.-S. et Adair M.-E. — *Biochem. J.*, **28,** 1230, 1934.
4. Adair G.-S. et Adair M.-E. — *Trans. Farad. Soc.*, **35,** 23, 1940.
5. Alberty R.-A. — *J. Chem. Education,* **25,** 426, 1948.
6. Alberty R.-A. — *J. Am. Chem. Soc.*, **72,** 2361, 1950.
7. Alberty R.-A. — *The Proteins,* by Neurath H. et Bailey K., Vol. 1, p. 461, Acad. Press Inc., New-York, 1953.
8. Alberty R.-A. et Marvin H.-H. — *J. Phys. Coll. Chem.*, **54,** 47, 1950.
9. Alberty R.-A. et Marvin H.-H. — *J. Am. Chem. Soc.*, **73,** 3220, 1951.
10. Alberty R.-A. et Nichol J.-C. — *J. Am. Chem. Soc.*, **70,** 2297, 1948.
11. Allen D.-W., Schroeder W.-A. et Balog J. — *J. Am. Chem. Soc.*, **80,** 1628, 1958.
12. Audubert R. et de Mende S. — *Les principes de l'électrophorèse,* Les Presses Universitaires de France, Paris, 1957.
13. Audubert R. et Quintin M. — *Electrochimie,* Les Presses Universitaires de France, Paris, 1942.
14. Ballou G.-A., Boyer P.-D. et Luck J.-M. — *J. Biol. Chem.*, **159,** 111, 1945.
15. Beaven G.-H., Hoch H. et Holiday E.-R. — *Biochem. J.*, **49,** 374, 1951.
16. Berry E.-R., Chanutin A. et Smith C.-A. — *J. Clin. Invest.*, **36,** 225, 1957.
17. Bethe A. et Toropoff T. — *Zeit. Physik. Chem.*, **88,** 686, 1914.
18. Bethe A. et Toropoff T. — *Zeit. Physik. Chem.*, **89,** 597, 1915.
19. Bigwood E.-J. — *Bull. Soc. Chim. Biol.*, **21,** 946, 1939.
20. Boivin P. et Hartmann L. — *Rev. Franç. Et. Clin. Biol.*, **3,** 50, 1958.
21. Boll M. — *Memento du Chimiste,* 1re partie, Dunod, Paris, 1957.
22. Brattsten I. et Svensson H. — *Acta Chem. Scand.*, **3,** 359, 1949.
23. Colobert L. et de Mende S. — *J. Chim. Phys.*, **53,** 206, 1956.
24. Cook J.-L. et Morrison M. — *Fed. Proceed.*, **15,** 235, 1956.
25. Dameshek W. — *Blood,* **10,** 293, 1955.

26. Davis B.-D. et Cohn E.-J. — *J. Am. Chem. Soc.*, **61**, 2092, 1939.

27. Derrien Y. — *Conference on Hemoglobin*, National Academy of Sciences, National Research Council, Washington, 1957, p. 183.

28. Derrien Y. et Cabannes R. — *Exp. Ann. Biochem Med.*, XXme série, Masson, Paris, 1958, p. 101.

29. Derrien Y., Laurent G. et Borgomano M. — *C. R. Acad. Sc.*, **242**, 1538, 1956.

30. Derrien Y., Laurent G. et Bouscayrol S. — *Bull. Soc. Chim. Biol.*, **40**, 99, 1958.

31. Derrien Y., Laurent G. et Reynaud J. — *C. R. Soc. Biol.*, **152**, 971, 1958.

32. Derrien Y. et Reynaud J. — *C. R. Soc. Biol.*, **147**, 660, 1953.

33. Derrien Y. et Reynaud J. — *C. R. Soc. Biol.*, **149**, 1595, 1955.

34. Derrien Y. et Reynaud J. — *XVème Congrès des Pédiatres de Langue Française, Marseille*, 1955, Communications, p. 178.

35. Diacono H. et Castay M. — *C. R. Soc. Biol.*, **151**, 845, 1957.

36. Dole V.-P. — *J. Am. Chem. Soc.*, **67**, 1119, 1945.

37. Drabkin D.-L. — *J. Biol. Chem.*, **164**, 703, 1946.

38. Goldwasser E. et Putnam F.-W. — *J. Phys. Coll. Chem.*, **54**, 79, 1950.

39. Gorin M.-H., Abramson H.-A. et Moyer L.-S. — *J. Am. Chem. Soc.*, **62**, 643, 1940.

40. Haurowitz F. — *Z. Physiol. Chem.*, **183**, 78, 1929 et **186**, 141, 1930.

41. Henriques O.-M. — *Ergebn. Physiol.*, **28**, 625, 1929.

42. Hoch H. — *Biochem. J.*, **42**, 181, 1948.

43. Hoch H. et Barr G.-H. — *Science*, **122**, 243, 1955.

44. Hoch-Ligetti C. et Hoch H. — *Biochem. J.*, **43**, 556, 1948.

45. Huisman T.-H.-J. et Prins H.-K. — *J. Lab. Clin. Med.*, **46**, 255, 1955.

46. Ingram V.-M. — *Nature*, **178**, 792, 1956 et **180**, 326, 1957.

47. Ingram V.-M. — *Conference on Hemoglobin*, National Academy of Sciences, National Research Council, Washington, 1957, p. 233.

48. Itano H.-A. — *Ann. Rev. Biochem.*, **25**, 331, 1956.

49. Itano H.-A. — *Fed. Proceed.*, **16**, 748, 1957.

50. Itano H.-A. et Robinson E. — *J. Am. Chem. Soc.*, **78**, 6415, 1956.

51. Itano H.-A. et Robinson E. — *Fed. Proceed.*, **16**, 858, 1957.

52. Itano H.-A. et Robinson E. — *Biochem. Biophys. Acta*, **29**, 545, 1958.

53. Johnston J.-P. et Ogston A.-G. — *Trans. Farad. Soc.*, **42**, 789, 1946.

54. Jonxis J.-H.-P. et Huisman T.-H.-J. — *Blood*, **11**, 1009, 1956.

55. King E.-J., Gilchrist M. et Delory G.-E. — *Lancet*, **1**, 239, 1944.

56. Klotz I.-M. et Urquhart J.-M. — *J. Phys. Coll. Chem.*, **53**, 100, 1949.

56bis Kohlrausch F. — *Ann. Phys. Chem.*, **62**, 209, 1897.

57. Kohlrausch F. et Holborn L. — *Das Leitvermögen der Elektrolyte*, Leipzig, 1916.

58. Kolin A. — *J. Chem. Phys.*, **22**, 1628, 1954.

59. Kolin A. — *Proc. Nat. Acad. Sc. U.S.*, **41**, 101, 1955.

60. Kunkel H.-G. et Wallenius G. — *Science*, **122**, 288, 1955.

61. Lagercrantz C. — *Ark. Kem. Min. Geol.*, **19 A**, N° 7, 1945.

62. Landolt H. et Bornstein R. — *Physikalisch Chemische Tabellen*, J. Springer, Berlin, 1894.

63. Laurent G. — *Recherches sur l'hétérogénéité des hémoglobines humaines.* Thèse Sc. Nat., Marseille, 1958, 128 pages.

64. Laurent G., Depieds J. et Derrien Y. — *C. R. Soc. Biol.*, **152**, 113, 1958.

65. Longsworth L.-G. — *Ann. N.-Y. Acad. Sc.*, **41**, 267, 1941.

66. Longsworth L.-G. — *J. Am. Chem. Soc.*, **65**, 1755, 1943.

67. Longsworth L.-G. — *J. Phys. Coll. Chem.*, **51**, 171, 1947.

68. Longsworth L.-G. et Jacobsen C.-F. — *J. Phys. Coll. Chem.*, **53**, 126, 1949.

69. Longsworth L.-G., Cannan R.-K. et Mac Innes D.-A. — *J. Am. Chem. Soc.*, **62**, 2580, 1940.

70. Longsworth L.-G. et Mac Innes D.-A. — *J. Am. Chem. Soc.*, **62**, 705, 1940.

71. Longsworth L.-G. et Mac Innes D.-A. — *J. Gen. Physiol.*, **25**, 507, 1941-42.

72. Luetscher J.-A. — *J. Am. Chem. Soc.*, **61**, 2888, 1939.

73. Luetscher J.-A. — *J. Clin. Invest.*, **19**, 313, 1939.

73bis Mac Innes D.-A. et Longsworth L.-G. — *Chem. Rev.*, **11**, 171, 1932.

74. Michaelis L. et Davidsohn H. — *Biochem. Z.*, **41**, 102, 1912.

75. Morrison M. et Cook J.-L. — *Science*, **122**, 920, 1955.

76. Mueller H. — *Proteins, Amino-acids and Peptides* by Cohn E.-J. and Edsall J.-T., Reinhold Publishing Corporation, New-York, 1943, p. 623.

77. Nichol J.-C. — *J. Am. Chem. Soc.*, **72**, 2367, 1950.

78. Ogston A.-G. et Tilley J.-M.-A. — *Biochem. J.*, **59**, 644, 1955.

79. Pauling L., Itano H.-A., Singer S.-J. et Wells I.-C. — *Science*, **110**, 543, 1949.

80. Prins H.-K. et Huisman T.-H.-J. — *Nature*, **177**, 840, 1956.

81. Putnam F.-W. — *Adv. Prot. Chem.*, **4**, 79, 1948.

82. Putnam F.-W. et Neurath H. — *J. Am. Chem. Soc.*, **66**, 692, 1944.

83. Putnam F.-W. et Neurath H. — *J. Biol. Chem.*, **159**, 195, 1945.

84. Reiss E. — *Abderhaldens Handbuch der biochemischen Arbeitmethoden*, 8e partie, pp. 84-119.

85. Reynaud J. — *Bull. Soc. Chim. Biol.*, **37**, 185, 1955.

86. Reynaud J. — *Bull. Soc. Chim. Biol.*, **39**, 647, 1957.

87. Reynaud J. — *Bull. Soc. Chim. Biol.*, **40**, 1197, 1958.

88. Reynaud J. — *Bull. Soc. Chim. Biol.*, **40**, 1189, 1958.

89. Rich A. — *Proc. Nat. Acad. Sc.*, **38**, 187, 1952.

90. Roche J., Derrien Y., Diacono G. et Roques M. — *C. R. Soc. Biol.*, **147**, 771, 1953 et *Rev. Hématol.*, **8**, 282, 1953.

91. Rossi-Fanelli A., Cavallini D. et de Marco C. — *Vme Congrès International de Transfusion Sanguine*, Paris, 1954, p. 407.

92. Saifer A. et Corey H. — *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.*, **86**, 46, 1954.

93. Scatchard G., Batchelder A.-C. et Brown A. — *J. Am. Chem. Soc.*, **68**, 2320, 1946.

94. Scatchard G. et Black E.-S. — *J. Phys. Coll. Chem.*, **53**, 88, 1949.

95. Scatchard G., Scheinberg I.-H. et Armstrong S.-H. — *J. Am. Chem. Soc.*, **72**, 535, 1950.

96. Scatchard G., Scheinberg I.-H. et Armstrong S.-H. — *J. Am. Chem. Soc.*, **72**, 540, 1950.

97. Schapira G., Dreyfus J.-C. et Kruh J. — *Vme Congrès International de Transfusion Sanguine*, Paris, 1954, p. 508.

98. Scheinberg I.-H., Harris R.-S. et Spitzer J.-L. — *Proc. Nat. Acad. Sc.*, **40**, 777, 1954.

99. Shavit N. et Breuer M. — *Biochem. Biophys. Acta*, **18**, 241, 1955.

100. Shedlovsky T. — *J. Am. Chem. Soc.*, **52**, 1793, 1930.

101. Singer K., Chernoff A.-I. et Singer L. — *Blood*, **6**, 429, 1951.

102. Steiner R.-F. — *Arch. Biochem. Biophys., U.S.*, **49**, 400, 1954.

103. Steinhardt J. — *Ann. N.-Y. Acad. Sc.*, **41**, 287, 1941.

104. Stern K.-G., Reiner M. et Silber R.-H. — *J. Biol. Chem.*, **161**, 731, 1945.

105. Svensson H. — *Ark. Kemi. Min. Geol.*, **17 A**, N° 14, 1943.

105bis Svensson H. — *Ark. Kemi. Min. Geol.*, **21 B**, N° 5, 1945.

106. Svensson H. — *Ark. Kemi. Min. Geol.*, **22 A**, N° 10, 1946.

107. Svensson H. — *Acta Chem. Scand.*, **2**, 841, 1948.

108. Svensson H. — *J. Am. Chem. Soc.*, **72**, 1974, 1950.

109. Tiselius A. et Svensson H. — *Trans. Farad. Soc.*, **35**, 16, 1940.

110. Vecchio F. — *Vme Congrès International de Transfusion Sanguine*, Paris, 1954, p. 376.

111. Velick S.-F. — *J. Phys. Coll. Chem.*, **53**, 135, 1949.

112. Vergnole J. — *Contribution à l'étude des mesures de conductivité dans l'électrophorèse des protéines*, Thèse Sc. Phys., Paris, 1951, 46 pages.

113. Wells I.-C. et Itano H.-A. — *J. Biol. Chem.*, **188**, 65, 1951.

114. Wiedemann E. — *Helv. Chim. Acta*, **30**, 892, 1947.

TABLE DES MATIÈRES

Pages

INTRODUCTION 11

OBJET DU TRAVAIL 15

Tableau récapitulatif des symboles utilisés 17

PREMIERE PARTIE

ANOMALIES DE FRONTIERES

I. Théorie de Svensson 21

II. Système de correction proposé par Hoch 40

A. *Définition du facteur expérimental* 41

B. *Principe du calcul* 46

C. *Cas particuliers* 48

DEUXIEME PARTIE

RECHERCHES PERSONNELLES

Chapitre Premier

Protocoles expérimentaux 53

A. *Préparation et dosage des solutions d'hémoglobine* 53

1. Photométrie 54
2. Réfractométrie 55

B. *Dialyse préparatoire* 56

C. *Détermination du pH* 56

D. *Conductimétrie* 56

1. Pont de mesure 56
2. Température 57
3. Cellules de conductivité 57
4. Enregistrement 57
   a) Electrodes 57
   b) Modalité de l'enregistrement 59

E. *Appareil à électrophorèse* 59

F. *Régulation automatique de la compensation* 59

1. Principe 59
2. Réalisation pratique 59
3. Fonctionnement 61
4. Application à la détermination des mobilités 62

Pages

G. *Calculs* 63
1. Gradient de potentiel et vélocité 63
2. Proportions relatives des constituants 64
a) Détermination du facteur K 64
b) Détermination graphique de la proportion réelle du constituant rapide 67

H. *Détermination de la mobilité de l'ion cacodylique* 72
1. Détermination de la conductivité équivalente de l'ion cacodylique 72
2. Dissociation de l'acide cacodylique 75
3. Coefficient d'activité du cacodylate de sodium 77

I. *Conditions expérimentales de l'électrophorèse en tampon de faible force ionique* 77
1. Courants électriques de fuite et gradients de pH 77
a) Etude expérimentale 78
b) Discussion 86
2. Détermination de la charge de l'ion hémoglobinique en tampon cacodylique de force ionique I = 0,0175 et de pH = 6,5 88

CHAPITRE II

Relations entre les incréments de conductivité mesurés en fin de dialyse et les anomalies de frontières. Interprétation 91

I. RÉSULTATS EXPÉRIMENTAUX 91

A. *Etude des incréments de conductivité* 92
1. Etude de $(\Delta\chi)_D$ 92
a) Influence de la force ionique I avec C_1 = cte 93
b) Influence de la nature de l'anion avec C_1 variable 95
c) Influence du pH avec C_1 variable 96
2. Etude de $(\Delta\chi)\delta$ et $(\Delta\chi)\varepsilon$ 97
a) Influence de la force ionique I avec C_1 = cte et pH = 6,5 99
b) Influence de la concentration protéique C_1 à pH = 6,5 et I = 0,0175 100
c) Influence du pH avec C_1 = cte et I = cte 100
3. Etude de $(\Delta\chi)_M$ 101
a) $(\Delta\chi)_{M\ obs.}$ et $(\Delta\chi)_{M\ calc}$ 102
b) Enregistrement simultané des gradients conductimétriques réfractométriques dans les deux branches 103

B. *Etude des gradients réfractométriques* 106
1. Influence de l'anion du tampon à concentration protéique C_1 = cte 106
2. Influence du pH 107
3. Influence de la force ionique à pH et C_1 constants 110
a) Force ionique et mobilité 110
b) Force ionique et gradient réfractométrique 114
4. Influence de C_1 à pH = 6,5 et I = 0,0175 114

II. INTERPRÉTATION 114

A. *Etat électrique de P* 117
1. pH < 7 119
a) Branche ascendante négative 119
b) Branche descendante positive 122
2. 7 < pH < 7,5 (pH_i) 123
3. pH = 7,51 (pH_i) 124
4. 7,5 < pH < 8 124
5. pH > 8 124

Pages

B. *Proportion relative des ions A — et P + mis en présence* 125
1. Influence de la force ionique à concentration protéique $C_1 = 1$ g. p. 100 ml et pH = 6,5 125
a) Sur les frontières mobiles 125
b) Sur les mobilités 126
2. Influence de la concentration protéique C_1 à force ionique I = cte et pH = 6,5 126

C. *Valence de l'anion A —* 127
1. Branche ascendante négative 127
2. Branche descendante positive 127

CHAPITRE III

Anomalies de frontières et hétérogénéité de l'hémoglobine de l'homme adulte normal 129

I. CONSTITUANTS MINORITAIRES 129

II. CONSTITUANTS MAJORITAIRES (hémoglobine) 131

I. Détermination des frontières anormales 131

II. Affinité protéine-anions 132

A. *Cas de l'oxy- et de la carboxyhémoglobine* 132

B. *Cas des mélanges de carboxy- et de ferrihémoglobine* 136
1. Influence du pH (cas des mélanges renfermant de 85 à 90 p. 100 de ferrihémoglobine 136
a) pH < pH_i 136
b) pH > pH_i 137
2. Influence de la quantité relative de carboxy- et de ferrihémoglobine 138
a) pH < pH_i 138
b) pH > pH_i 139
3. Influence de l'addition d'une protéine plus rapide 139

C. *Cas de la cyanmethémoglobine* 140

D. *Conclusions* 141

CHAPITRE IV

Etude comparée du comportement électrophorétique en tampon cacodylique de faible force ionique des carboxyhémoglobines d'adulte, de nouveau-né et de sujets atteints d'anémie de Cooley 143

A. *Résultats expérimentaux* 145

B. *Discussion* 145

Conclusions générales 149

A. *Affinité protéine-anion et anomalies de frontières* 149

B. *Hétérogénéité de l'hémoglobine humaine adulte* 150

C. *Le pigment alcalinorésistant des sujets atteints d'anémie de Cooley est distinct de l'hémoglobine fœtale* 151

Bibliographie 152

ANNEXES : 26 tableaux et 56 figures

DEUXIEME THESE

Propositions données par la Faculté

« *Individualisation et séparation de deux hémoglobines d'espèce animale différente par dissolution continue du mélange de leurs cristaux* ».

Vu et approuvé :
Paris, le 19 Juin 1959
Le Doyen de la Faculté des Sciences,
J. Peres.

Vu et permis d'imprimer :
Le Recteur de l'Académie de Paris,
Jean Sarrailh.

ERRATA

Page :	*Ligne :*	*Au lieu de :*	*Lire :*
12	9	accroissement	abaissement
15	8	conduit	conduits
18	10 et 12	exprimé	exprimée
24	3	valable	valables
39	17	indéterminé	indéterminée
39	35	augmenté	augmentée
43	8 et 9	$\frac{1}{1 + a c}$	$\frac{1}{1 + a C}$
43	11	présent	précédent
44	16	tampons	du tampon
60	12	adjoncton	adjonction
75	18	Λ acide	Λ_{acide}
77	4	calculé	calculée
89	Réf. :	$\Lambda \infty$ F	$\Lambda \infty$ /F
118	28	suivante	suivantes
122	41	figures 42	figure 42
133	17	conduit	conduits